

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock
Direktor: Professor Dr. med. R. Guthoff

**Pharmakologische in-vitro-Inhibition von humanen
Linsenepithelzellen zur Prävention der
Cataracta secundaria**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Sabine Kwittner
aus Bergen auf Rügen

Rostock, 13.Oktober 2010

Prof. Dr. Emil Christian Reisinger
Dekan

Prof. Dr. Emil Christian Reisinger
Dekan

1. Gutachter: Prof. Dr. Ria Beck; Universität Rostock, Klinik für
Augenheilkunde, Doberaner Strasse 140, D-18057 Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. Katrin Sternberg; Universität Rostock, Institut für
Biomedizinische Technik, Friedrich-Barnewitz-Strasse 4,
D-18119 Rostock
3. Gutachter: Dr. Theo G. van Kooten; University Medical Center Groningen,
Department of Biomedical Engineering, A. Deusinglaan 1,
9713 AV Groningen, The Netherlands

Datum der Verteidigung: 13. Oktober 2010

1. Einleitung	1
1.1 Nachstar - Definition, Entstehungstheorien und pathophysiologische Zusammenhänge	1
1.1.1 Definition und zellulärer Ursprung der Cataracta secundaria	1
1.1.2 Extrazelluläre Matrix-Proteine im Zusammenhang mit Nachstarbildung	2
1.2 Differenzierung und Inzidenz des Nachstars	5
1.2.1 Formen des Nachstars	5
1.2.2 Inzidenz	6
1.3 Einflussfaktoren	7
1.3.1 Patientenabhängige Faktoren	7
1.3.2 Operationsabhängige Faktoren	8
1.3.3 Intraokularlinsen-assoziierte Faktoren	8
1.4 Therapie des Nachstars	10
1.4.1 Neodymium:YAG-Laser-Kapsulotomie	10
1.4.1.1 Komplikationen	11
1.4.2 Chirurgische Nachstarentfernung	11
1.5 Prävention des Nachstars	12
1.5.1 Chirurgischer Ansatz	12
1.5.2 Mechanisch-physikalischer Ansatz	12
1.5.2.1 Der Kapselspannring	13
1.5.3 Pharmakologischer Ansatz	13
1.6 Bisherige Untersuchungsmethoden zur Nachstar-Evaluierung	19
1.6.1 In-vivo-Methode	19
1.6.2 Post mortem-Methode	20
1.6.3 Tierexperimentelle Methode	20
1.6.4 In-vitro-Methode	21
1.6.4.1 Zellkultur-Versuche	21
1.6.4.2 Modelle	21
1.7 Anforderungen an ein ideales System zur Nachstaruntersuchung	22

2. Ziel der experimentellen Arbeit	24
---	-----------

3. Material und Methoden	25
---------------------------------	-----------

3.1 Das Mibefradil	25
---------------------------	-----------

3.2 Der Kapselspannring	26
--------------------------------	-----------

3.3 Immobilisierung von gelöstem Mibefradildihydrochlorid und Kopplung an die Kapselspannringoberfläche (Machbarkeitsstudie)	27
---	-----------

3.3.1	Solvent-Evaporation-Verfahren zur Herstellung von Mibefradil-beladenen Mikrokapseln	27
-------	---	----

3.3.2	UV-Spektroskopie zur Untersuchung der Wirkstofffreisetzung	27
-------	--	----

3.3.3	Chemische Ankopplung von Mibefradil-beladenen Mikrokapseln an die Kapselspannringoberfläche	28
-------	---	----

3.4 Das Kapselsack-Modell	29
----------------------------------	-----------

3.4.1	Präparation und Kultivierung der humanen Kapselsäcke	29
-------	--	----

3.5 Beobachtung und Messung des Wachstums von humanen Linsenepithelzellen unter permanentem Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten	32
---	-----------

3.6 Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten auf die metabolische Aktivität humaner Linsenepithelzellen	33
--	-----------

3.7 Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten auf die Vitalität humaner Linsenepithelzellen	34
---	-----------

3.8 Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten auf das Aktinzytoskelett in humanen Linsenepithelzellen	35
---	-----------

3.9 Statistische Auswertung	36
------------------------------------	-----------

4. Ergebnisse	37
----------------------	-----------

4.1 Untersuchungen zur in-vitro Freisetzung von Mibefradil-beladenen Mikrokapseln	37
--	-----------

4.2 Untersuchungen zum Zellwachstum und zur Morphologie humaner Linsenepithelzellen nach Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten	38
--	-----------

4.2.1	Mibefradil-beladene Mikrokapseln in freier Form	38
-------	---	----

4.2.2	Mibefradil-beladene Mikrokapseln gekoppelt an die Kapselspannringoberfläche	41
-------	---	----

4.3	Untersuchungen zur metabolischen Aktivität humaner Linsenepithelzellen nach Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten	42
4.4	Untersuchungen zur Vitalität humaner Linsenepithelzellen nach Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten	44
4.5	Untersuchungen zum Aktinzytoskelett humaner Linsenepithelzellen nach Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten	45
5. Diskussion		46
<hr/>		
5.1	Methodenkritische Bemerkungen	46
5.2	Einschätzung der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur	49
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick	51
6. Zusammenfassung		53
<hr/>		
7. Literaturverzeichnis		56
<hr/>		
8. Thesen		73
<hr/>		
9. Lebenslauf		75
<hr/>		
10. Veröffentlichungen		77
<hr/>		
11. Danksagung		79
<hr/>		
12. Erklärung an Eides statt		80
<hr/>		

1. Einleitung

1.1 Nachstar - Definition, Entstehungstheorien und pathophysiologische Zusammenhänge

1.1.1 Definition und zellulärer Ursprung der Cataracta secundaria

Der Begriff Nachstar bezeichnet die sekundäre Eintrübung der Linsenkapsel oder der Linsenepithelzellen (LEZ) nach erfolgter Kataraktextraktion. Ein klinisch signifikanter Nachstar kann bei den Betroffenen zu einer Minderung der Sehschärfe, der Farbwahrnehmung und des Kontrastsehens sowie zu einer erhöhten Blendung führen (Buehl et al. 2005a, Jose et al. 2005). Des Weiteren kann es bedingt durch eine Kapselfibrose und Kapselsackschrumpfung, vor allem im Bereich der vorderen Linsenkapsel, zu einer Linsendislokation kommen. Diese kann in der Folge zum Abfall der Sehschärfe und zu Doppelbildern führen. Ursächlich für die Nachstarausbildung ist die Besiedlung der Hinterkapsel mit postoperativ verbliebenen LEZ (Apple et al. 1992, Ohadi et al. 1991).

Apple und Rabb (1998) untergliedern fünf verschiedene Zelltypen, die einen Nachstar verursachen können:

1. Epithelzellen des vorderen Kapselblattes und des Äquators sowie epitheliale Zellen, die auf die Hinterkapsel migrieren,
2. rückständige Linsenfasern,
3. Wedl-Zellen, als histopathologisches Korrelat für die klinisch sichtbaren Hirschberg-Elschnig-Perlen, welche den sogenannten Soemmering-Ring bilden (Apple und Rabb 1998, Apple et al. 1992),
4. Fibrozyten-ähnliche Zellen, die durch Metaplasie verbliebener LEZ entstehen,
5. myoepitheliale Zellen, die kontraktile glatte Muskelfaserelemente enthalten und durch Transformation aus LEZ hervorgehen.

LEZ aus dem Äquatorialbereich, sogenannte E-Zellen, sind mitotisch aktiv und in erster Linie ursächlich für den klassischen Nachstar der hinteren Linsenkapsel. Die sogenannten A-Zellen, die als Monolayer der vorderen Linsenkapsel anhaften, weisen wenig Proliferationsaktivität auf (Peng et al. 2000a, Auffarth und Völcker 2001). Linsenepithelzellen können Prostaglandine sowie verschiedene Zytokine wie Interleukin-1 und Interleukin-6 synthetisieren, wobei die Interleukinsynthese durch

den Kontakt der LEZ mit der IOL induziert scheint, wie Nishi in Zellkultur-Versuchen nachweisen konnte (Nishi et al. 1996a, 1996b). Interleukine induzieren ihrerseits die Synthese von Prostaglandin E2 (PGE2). Nishi und Miyake (1996a) gehen davon aus, dass bedingt durch die LEZ-Prostaglandin-Kaskade eine Störung der Blut-Kammerwasser-Schranke hervorgerufen wird. Diese führt wiederum zu einer inflammatorischen Reaktion inklusive Fibrinbildung.

1.1.2 Extrazelluläre Matrix-Proteine im Zusammenhang mit Nachstarbildung

Der Pathomechanismus der Nachstarbildung wird heute wie folgt verstanden: Im Zusammenhang mit dem bei der Kataraktoperation gesetzten Wundreiz einschließlich der Kapsulorhexis kommt es zum Zusammenbruch der Blut-Kammerwasser-Schranke, in Folge dessen es zu einem ungehinderten Übertritt von Serumbestandteilen in den vorderen Augenabschnitt kommt. Die Sekretion von Entzündungszellen (Zytokinen) führt zu einer überschießenden Proliferation und fehlgeleiteten Differenzierung der Linsenepithelzellen. Die in der Linsenkapsel verbliebenen Linsenepithelzellen weisen nach der Transformation kontraktile Filamente sowie eine modifizierte Kollagensynthese auf (Jacob et al. 1987). Sie erscheinen wie Myofibroblasten und exprimieren glattmuskuläres α -Aktin. Verantwortlich für die Induktion ist der transformierende Wachstumsfaktor TGF- β (transforming growth factor- β).

Die Kataraktoperation führt zu einer Wundheilungsreaktion mit Zellproliferation und zu einer Suppression der Extrazellulärmatrix (EZM) (Saika et al. 1995, Pande et al. 1996a, Azuma et al. 1998). Der beim Nachstar auftretende Visusverlust ist bedingt durch die zentripetale Migration der Linsenepithelzellen verbunden mit Fibrose und Fältelung der hinteren Kapsel. Histologisch sind zwei Gebiete mit zellulärer Aktivität von Bedeutung: zum einen die kuboiden vorderen Epithelzellen und zum anderen die äquatorialen LEZ.

Morphologisch werden zwei Formen des Nachstars beschrieben:

1. *Der fibrotische Nachstar*

Diese Form des Nachstars entsteht durch die oben schon beschriebene Wanderung von vorderen und äquatorialen LEZ auf die hintere Kapsel. Die zu Myofibroblasten transformierten Zellen führen zu einer weißlichen Trübung, die sich auch auf die vorderen Kapselreste

ausdehnen kann. Die kontraktile Eigenschaften dieser Zellen sind begleitet von einer Fältelung der hinteren Kapsel.

2. *Der regeneratorsche Nachstar*

Hier beobachtet man die Bildung von lockerem, kugligem, froschlaichartigem Kollagenmaterial durch die Linsenepithelzellen, die als Elschnig-Perlen oder Wedlersche-Blasenzellen imponieren (Abb. 1.1). Diese weisen nur eine geringe Haftung mit der hinteren Kapsel auf und können operativ leicht entfernt werden.

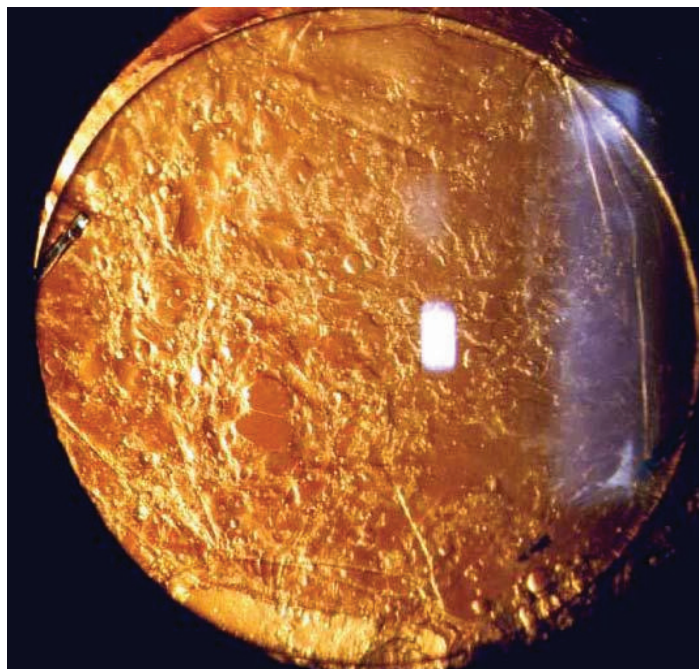


Abb. 1.1: Regeneratorischer Nachstar mit Elschnig-Perlen im regredienten Licht (Univ.-Augenklinik Rostock).

Die vorderen Linsenepithelzellen durchlaufen anfänglich eine Hyperplasie und wandeln sich in spindelförmige Myofibroblasten. Der Prozess startet an der Kapsulorhexisschnittkante der vorderen Kapsel (Caporossi et al. 1998). Die Zellen sind von einer mehrschichtigen Basalmembran umgeben und bestehen aus Proteoglykanen, Kollagenfibrillen - die vorherrschenden Kollagentypen sind Kollagen I, IV, V, VI - und einer Isoform des Actins, dem α -smooth muscle actin (α -SMA). Das glattmuskuläre α -Aktin verleiht der Zelle kontraktile Eigenschaften und aufgrund seiner longitudinalen Ausrichtung könnte es Ursache für die Fältelung der hinteren Kapsel sein (Schmitt-Graff et al. 1990). Auch die Äquatorialzellen sind imstande, eine fibröse Metaplasie zu durchlaufen. Diese Zellen haben eine stärkere Tendenz,

Richtung Hinterkapsel zu migrieren, als LEZ. Wedlersche-Blasenzellen sind nicht in der Lage, α -SMA zu bilden.

Zytokine wie das TGF- β spielen eine zentrale Rolle in der Zellbiologie der Cataracta secundaria. Zytokine sind Peptide, die von Zellen sezerniert werden und dann autokrin oder parakrin Wirkung auf ihre Zielzelle zeigen. TGF- β nimmt eine zentrale Rolle im Wundheilungsprozess ein durch die Regulation des Zellwachstums, der Matrixproduktion und der Entzündungsreaktion. Es ist wichtig für die Produktion und das Remodelling der EZM, die Kontrolle von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. TGF- β inhibiert das Zellwachstum, induziert Mitose in mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten und hat Auswirkungen auf die Zelldifferenzierung. Es wurde gezeigt, dass TGF- β Veränderungen im Rahmen der Kataraktgenese auslöst und im Zusammenhang mit der Wundheilungsreaktion vermehrt auftritt (Gordon-Thomson et al. 1998). Nach der extrakapsulären Kataraktextraktion kommt es zu einem initialen Abfall von TGF- β , was die Proliferation, bedingt durch andere Wachstumsfaktoren wie Basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF), epidermaler Growth Factor (EGF), fördert. Unmittelbar postoperativ ist dann auch die Proliferationsrate am höchsten und fällt in dem Maße, wie die TGF- β -Konzentration wieder ansteigt. Es wird postuliert, dass TGF- β den proliferativen Effekt durch Suppression anderer Zytokine im Kammerwasser hemmt (Kurosaka et al. 1994). TGF- β reguliert die Expression von Komponenten der Extrazellulärmatrix wie Proteoglykane, Fibronectin (Kim et al. 1992), Kollagen und Oberflächenproteine, die die Matrixproteine binden. Beim Nachstar sezernieren Linsenepithelzellen Kollagen, was durch die Anwesenheit von TGF- β verstärkt wird (Olivero et al. 1993, Linnola et al. 2000a, Linnola et al. 2000b).

Das extrazelluläre Gleichgewicht ist bestimmt durch die Balance abbauender Enzyme, Matrixmetalloproteinasen (MMP) und spezifischer Inhibitoren, die als TIMP bezeichnet werden und die MMP hemmen. TGF- β senkt die Produktion MMP-1 (Kollagenase) und erhöht TIMP in Fibroblasten, was zu einer Vermehrung der Extrazellulärmatrix führt. Außerdem steigert TGF- β den Spiegel von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1, weshalb Plasminogen nicht mehr zu Plasmin aktiviert werden kann und damit eine indirekt Hemmung des Kollagenabbaus induziert.

Auch Oberflächenrezeptoren (Integrine), die die Zelladhäsion vermitteln, werden durch TGF- β reguliert. Integrine sind Glykoproteine, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, die die Plasmamembran durchspannen und mit Aktin

interagieren. Integrine stellen somit das Bindeglied zwischen EZM und Zytoskelett dar. Die Bindung extrazellulärer Proteine erfordert die Anwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} innerhalb der α -Kette. Die β -Untereinheit erkennt eine Arginin-Glycin-Aspartat-Säuresequenz extrazellulärer Proteine. Linsenepithelzellen exprimieren β 1-Integrin, I-CAM 1 (intrazelluläres Adhäsionsmolekül) und CD 44. Linsenepithelzellen benötigen I-CAM 1 für die Bindung von Laminin und Kollagen Typ IV und damit für die Anheftung an die Linsenkapsel. TGF- β induziert auch Apoptose. Transformierte Linsenepithelzellen nehmen nach anfänglicher Proliferation infolge Apoptose ab (Saika et al. 1998a, 1998b, 1998c, 1998d, Saika et al. 2000, Saika et al. 2001).

Andere Zytokine, wie zum Beispiel das b-FGF, können in der Linse nachgewiesen werden und sind in die Entwicklung involviert (McAvoy et al. 1989, Wormstone et al. 2001). B-FGF reguliert in ektodermalen und mesodermalen Zellen die Zellproliferation und -migration. In der Linse stimuliert es die Faserdifferenzierung. Nach Kataraktoperation kommt es zum Anstieg von b-FGF, wobei es die Mitose in den Linsenepithelzellen stimuliert und den Kollagengehalt steigert. B-FGF und TGF- β weisen eine entgegengesetzte Wirkungsweise auf, zudem hat TGF- β eine hemmende Wirkung auf b-FGF.

Interleukine sind weitere Zytokine, die vor allem einen Einfluss auf die Entzündungsreaktion zeigen. IL-1 wird von LEZ gebildet, es induziert Mitose, stimuliert die Kollagensynthese, steigert die Synthese von Prostaglandin E2 (PGE2) durch Aktivierung der Phospholipase A2 und Cyclooxygenase im Arachidonestoffwechsel und steuert somit die Entzündungsreaktion nach Kataraktoperation. IL-6 bewirkt die Proliferation und Differenzierung von Zellen und induziert die Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber. IL-1 induziert die Sekretion von IL-6 aus den Epithelzellen der Venen. Es könnte sein, dass der Effekt von IL-1 durch die IL-6-Produktion vermittelt wird. Studien dazu stehen noch aus.

1.2 Differenzierung und Inzidenz des Nachstars

1.2.1 Formen des Nachstars

In Abhängigkeit von der Lokalisation der Nachstarmembran kann man anatomisch zwei Formen der Cataracta secundaria unterscheiden: zum einen den vorderen Nachstar der Vorderkapsel und zum anderen den hinteren Nachstar der Hinterkapsel. Histologisch muss man zwischen einer Fibrose bzw. einer

regeneratorischen Proliferation verbliebener LEZ differenzieren. Naumann (1997) unterscheidet pathogenetisch die *Cataracta secundaria simplex* von der *Cataracta secundaria accreta*, die infolge von Blutungen oder Entzündungen auftritt. Beim fibrotischen Nachstar kommt es aufgrund der Proliferation von LEZ im Äquator und deren Transformation zu Myofibroblasten zur Bildung einer fibrösen Matrix, die sich auf die Innenseite der Hinterkapsel, in Richtung optischer Achse, ausdehnt. Die kontraktile Anteile, Myofibroblasten, der fibrösen Nachstarmasse können durch Kontraktion zur Faltenbildung der Hinterkapsel führen. Im Rahmen des fibrotischen Nachstars kann auch die Vorderkapsel betroffen sein und somit zu einem Verschluss der Kapsulotomie mit Kapselkontraktion und Fältelung führen. Dem regeneratorischen Nachstar liegt eine Transformation verbliebener LEZ zu sogenannten Wedl-Blasenzellen zugrunde. Die Wedl-Blasenzellen sind abnorme globuläre Faserzellen, die als Elschnig-Perlen ein Konglomerat auf der Hinterkapsel bilden und zu einer Trübung der optischen Achse führen. Migrieren die Wedl-Blasenzellen nicht und verbleiben am Äquator, spricht man von der Soemmerring-Ringkatarakt. Die *Cataracta secundaria accreta* entsteht am häufigsten nach einer extrakapsulären Kataraktextraktion bei Iridozyklitis. Hierbei weisen die Nachstarmassen zusätzlich Entzündungszellen und Zellen angrenzender Strukturen auf und es kommt zur Bildung von einzelnen Synechien bzw. zur Plaquebildung (Naumann 1997).

1.2.2 Inzidenz

Nach wie vor ist die *Cataracta secundaria* die häufigste Spätkomplikation nach Kataraktextraktion. Die Angaben zur Inzidenz in der Literatur weisen eine große Schwankungsbreite auf. In den ersten fünf Jahren nach Kataraktoperation schwankt die Inzidenz zwischen 0% bis 30% (Apple et al. 1992, Hollick et al. 1999b, Schmidbauer et al. 2001, Sundelin und Sjöstrand 1999). Die Gründe hierfür sind vielfältig. Zum einen liegen der Nachstarentwicklung verschiedene Einflussfaktoren zugrunde, zum anderen unterscheiden sich die Verfahren zur Dokumentation des Nachstars, und die häufig zu Vergleichen herangezogene Neodymium:Yttrium-Aluminium-Garnet(Nd:YAG)-Kapsulotomie-Rate ist eher ungenau (Bertelmann und Kojetinsky 2001, Aslam et al. 2002). Schaumberg (1998) führte eine Meta-Analyse

durch und fand dabei eine Nachstarinzidenz von 11,8% ein Jahr postoperativ, 20,7% nach drei Jahren sowie nach fünf Jahren eine Inzidenz von 28,4%.

Im Verlauf der vergangenen Jahrzehnte ist tendenziell eine sinkende Inzidenz festzustellen (Apple et al. 2001, Auffarth et al. 2002, Buehl et al. 2002, Hayashi et al. 2001, Meacock et al. 2001).

1.3 Einflussfaktoren

Wie schnell ein Nachstar postoperativ auftritt und in welcher Schwere ist im Wesentlichen abhängig von der Operationstechnik, der verwendeten Intraokularlinse sowie von der Konstitution und dem Alter der Patienten (Tetz et al. 1999, Apple et al. 2000).

1.3.1 Patientenabhängige Faktoren

Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation ist ein wesentlicher Faktor für die Inzidenz eines Nachstars. Dabei gilt, je älter der Patient zum Zeitpunkt der Operation, desto geringer die Nachstarhäufigkeit. Bei Kindern wird eine erhöhte Geschwindigkeit der Nachstarentwicklung (Tetz et al. 1999) sowie eine insgesamt erhöhte Nachstarrate, zwischen 50% und 95% (Eckstein et al. 1998, Krishnamachary et al. 1997, Zwaan et al. 1998, Knight-Nanan et al. 1996, Bakunowicz-Lazarczyk et al. 1996, Malukiewicz-Wisniewska et al. 1999, Brady et al. 1995), beobachtet.

Zellkultur-Versuche zeigten ein erhöhtes Wachstumspotential der LEZ bei Jüngeren als bei Alten (Majima 1995, Wormstone et al. 1997). Diabetes mellitus stellt zudem eine Einflussgröße auf die Nachstarentstehung dar (Dureau et al. 1997, Hayashi et al. 1998a, Hayashi et al. 2002, Kato et al. 2001). Dabei scheint die Beteiligung der Netzhaut im Sinne einer proliferativen diabetischen Retinopathie eine Rolle zu spielen. Insgesamt sind die genaue Korrelation sowie die zugrundeliegenden Mechanismen nicht geklärt.

Bislang ist kein Zusammenhang zwischen präoperativer Kataraktform und postoperativer Nachstarinzidenz nachgewiesen (Tetz et al. 1996a u. 1996b).

Eine positive Korrelationsrate wurde bei Patienten mit Retinitis pigmentosa (Auffarth et al. 1997a u. 1997b), Exfoliatio lentis (Küchle et al. 1997), Uveitis (Krishna et al. 1998, Dana et al. 1997), bei Patienten mit einer extremen axialen Bulbuslänge bei

hoher Myopie oder Hyperopie (Izák et al. 1996, Ignjatovic 1998, Jimenez-Alfaro et al. 1998, Malukiewicz-Wisniewska et al. 1996, Ceschi u. Artaria 1998, Nissen et al. 1998) sowie nach Lensektomie der klaren Linse im Rahmen eines refraktiven Eingriffs (Siganos u. Pallikaris 1998, Colin et al. 1997, Kohnen u. Brauweiler 1996, Lyle u. Jin 1996) gefunden. Zu berücksichtigen ist jedoch in diesen Arbeiten das geringe Patientenalter als wesentlicher Faktor in Bezug auf die Nachstarinzidenzen (Lee u. Lee 1996).

1.3.2 Operationsabhängige Faktoren

Während der Kataraktoperation wird das vordere Kapselblatt zentral im Rahmen der Kapsulorhexis kreisrund eröffnet. Der Kapselsack verbleibt dabei in seiner anatomischen Position an den Zonulafasern. Mittels Ultraschall (Phakoemulsifikation) wird die Linse zerkleinert und anschließend der Linseninhalt abgesaugt. Im nächsten Schritt wird der Kapselsack gründlich poliert, so dass möglichst wenig LEZ verbleiben. Abschließend wird die Kunstlinse in den Kapselsack eingebracht.

Im Wesentlichen sind drei Faktoren, die zur Reduktion der Nachstarentstehung beitragen, anzuführen (Schmidbauer et al. 2002a, Schmidbauer et al. 2002b):

1. gründliche intraoperative Kapselpolitur,
2. IOL-Platzierung im Kapselsack,
3. geringerer Kapsulorhexis-Durchmesser als der Durchmesser der IOL-Optik, sodass der Optikrand komplett überlappt wird (Hollick et al. 1999a).

1.3.3 Intraokularlinsen-assoziierte Faktoren

Die erste Kunstlinsenimplantation führte im November 1949 Sir Harold Ridley durch. Die Kunstlinse bestand dabei aus Plexiglas (Polymethylmetacrylat [PMMA]) und war bikonkav gestaltet (Rosen 1997). Während des Zweiten Weltkrieges beobachtete Ridley bei Piloten mit Plexiglaseinsprengungen in den Augen, dass keine Fremdkörperreaktionen auf das Material auftraten. PMMA war jahrzehntelang das einzige Linsenmaterial und ist bis in die heutige Zeit hinein das am weitesten verbreitete Kunstlinsenmaterial (Ridley 1951).

Charles Kelman (1967) führte die Phakoemulsifikation mittels Ultraschall als heutiges minimal invasives Standardverfahren in die Kataraktchirurgie ein. Bedingt durch den

kleineren intraokularen Zugang ergab sich die Notwendigkeit, flexible, faltbare Kunstlinsen zu entwickeln. Damit begann gleichzeitig die Suche nach alternativen Materialien, die bessere Eigenschaften auf sich vereinigen und zudem eine geringere Nachstarrate induzieren als die bisher gebräuchlichen PMMA-Linsen.

Entscheidend für die Nachstarinhibition ist das Design der Intraokularlinsen. Nishi fand in zahlreichen Untersuchungen heraus, dass eine scharfe Kante der hinteren Optik maßgeblich zur Nachstarhemmung beiträgt. Das heißt, je schärfer die Kante, desto geringer der Nachstar (Nishi und Nishi 2002). Dieser Effekt ist materialunabhängig (Nishi et al. 2001, Nishi et al. 2000, Nishi et al. 1998a, Nishi und Nishi 1999). Bedingt durch die scharfe Kante entsteht ein scharfer Knick in der Hinterkapsel, somit liegt das hintere Kapselblatt direkt der Linsenhinterfläche an, wodurch eine Barriere für die LEZ entsteht (Peng et al. 2000b, Kruger et al. 2000, Buehl et al. 2002b, Sacu et al. 2004a, Sacu et al. 2004b, Buehl et al. 2005, Findl et al. 2005, Sacu et al. 2005). Auf der Grundlage dieser Beobachtung entwickelte Nishi auch den Kapselknickring zur Nachstarprävention (Nishi et al. 1998b).

Weitere Faktoren für die Nachstarhemmung sind die Größe der IOL-Optik, die Konvexität der IOL-Optik, der Winkel der Haptik, das Design der Haptik sowie das Linsenmaterial.

Größe der IOL-Optik: Hydrophobe Akryllinsen mit 6,0 mm Optikdurchmesser zeigten nach einem Jahr statistisch signifikant weniger Nachstar als die gleiche Linse mit 5,5 mm Optikdurchmesser (Meacock et al. 2001). Hinsichtlich der Nd:YAG-Kapsulotomie-Rate zeigte sich bezogen auf den Gesamtdurchmesser ein umgekehrtes Verhältnis. Für Linsen mit einem Durchmesser von 13,5 mm oder mehr lag die YAG-Rate bei 38% im Vergleich zu 16% für IOL mit einem Durchmesser von weniger als 13,5 mm (Mamalis et al. 1995).

Konvexität: Plan-konvexe IOL zeigten geringere Nachstarraten als bikonvexe IOL (Nagamoto u. Eguchi 1997). Klinische Daten zeigten geringe YAG-Kapsulotomie-Raten für IOL mit konvexer Rückfläche im Vergleich zu IOL mit planer Rückfläche (Born u. Ryan 1990). Gleiches gilt für Meniskus-Linsen (Hansen T.E. et al. 1988).

Winkel der Haptik: Um einen maximalen Kontakt von der IOL zur Hinterkapsel zu erreichen, ist auch der Winkel der Haptik zur IOL entscheidend. Dabei scheint eine Abwinklung von über 10° am effektivsten (Wesendahl et al. 1994). Mehrere Autoren konnten einen positiven Effekt der Haptikabwinklung hinsichtlich einer

Nachstarinhibition zeigen (Apple et al. 1992 u. 2001, Hansen S.O. et al. 1988, Sterling u. Wood 1986, Davis u. Hill 1989).

Design der Haptik: In Untersuchungen konnte ein günstigerer Effekt für flexible Disc-IOL im Vergleich zu IOL mit J-Haptiken gezeigt werden (Tetz et al. 1988).

Linsenmaterial: Nach Einführung der hydrophoben Akryllinsen AcrySoft® im Jahre 1994 zeigte sich eine deutliche Reduktion der Nachstarraten für diesen Linsentyp (Ursell et al. 1998, Hayashi et al. 1998b, Hollick et al. 1999b, Hollick et al. 1998a, Hollick et al. 1998b, Oshika et al. 1996, Ram et al. 2001b). Für scharfkantige Silikonlinsen konnten ebenso gute Nachstarwerte gezeigt werden (Abela-Formanek et al. 2002). Das Linsenmaterial allein betrachtet bewirkt ein unterschiedliches Wachstum von LEZ auf der Linsenoberfläche (Schauersberger et al. 2001). Hinsichtlich der Nd:YAG-Kapsulotomie-Raten fanden sich signifikant höhere Werte bei hydrophilen Akryllinsen im Vergleich zu hydrophoben Akryllinsen (Javdani et al. 2002).

1.4 Therapie des Nachstars

1.4.1 Neodymium:YAG-Laser-Kapsulotomie

Die Neodymium:Yttrium-Aluminium-Garnet(Nd:YAG)-Kapsulotomie nach Katarakt-Operation ist die am häufigsten eingesetzte Methode zur Nachstarbehandlung. Dabei wird die hintere Linsenkapsel zentral eröffnet (Abb. 1.2). Durch Photodisruption auf extrem hohem Energieniveau wird eine Desintegration des Gewebes bewirkt (Aron-Rosa et al. 1981, Barnes und Rieckhoff 1968, Bell und Landt 1967, Ficker und Steele 1985, Fradin et al. 1973). Dabei wird die Nachstarmembran zentral mit dem Laser fokussiert. Die abgegebene Energie wird hierbei absorbiert und das Zielgewebe in einen gasförmigen Zustand ionisiert. Daraus resultiert eine kurzzeitige lokale Temperaturerhöhung auf rund 10.000° C, in deren Folge eine schnelle Expansion mit explosiver Kraft und ausgeprägter Schockwelle entsteht.

Die Nd:YAG-Kapsulotomie ist ein einfaches und schnell durchzuführendes Verfahren ohne Eröffnung des Bulbus. Dennoch ist die Nd:YAG-Laser-Kapsulotomie nicht frei von Komplikationen.

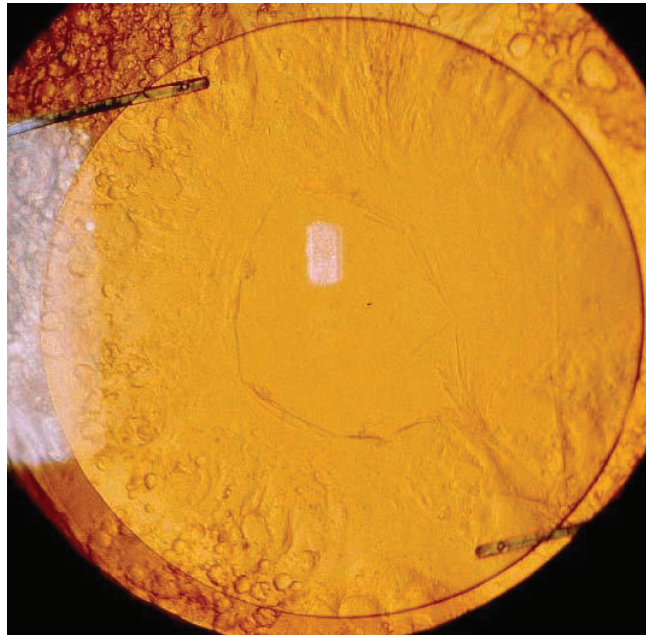


Abb. 1.2: Regeneratorischer Nachstar der Hinterkapsel im regredienten Licht nach Nd:YAG-Laser-Kapsulotomie (Univ.-Augenklinik Rostock).

1.4.1.1 Komplikationen

Shah et al. (1986) beschrieben nach einer Analyse zahlreicher Nd:YAG-Kapsulotomien folgende Komplikationen: Beschädigung der IOL (12%), vorübergehender intraokularer Druckanstieg (8,5%), zystoides Makulaödem (0,68%), Netzhautablösung (0,17%), Hyphäma (0,15%), Iritis im Sinne einer Exazerbation (0,10%), IOL-Dislokation (0,10%).

Prinzipiell kann jedes IOL-Material durch den Laser beschädigt werden, wobei es Unterschiede hinsichtlich Energie-Schwellenwert und Laser-Einschlagtiefe bzw. Durchmesser des Einschlags gibt (Dick et al. 1997, Newland 1994, Newland 1999, Bath 1987).

Ein erhöhter Augeninnendruck nach Nd:YAG-Kapsulotomie kann vorübergehend (Shah et al. 1986), aber auch für längere Zeit (Fourman u. Apisson 1991, Steinert et al. 1991, Jahn u. Emke 1996) bestehen. Weiterhin ist das Risiko für die Progression eines vorbestehenden Glaukoms erhöht (Steinert et al. 1991).

1.4.2 Chirurgische Nachstarentfernung

Die Eröffnung der Hinterkapsel zur Nachstarentfernung kann alternativ auch chirurgisch, durch eine bulbuseröffnende Operation, erfolgen. Dabei wird die

Nachstardisziision via Pars plana durchgeführt. Damit verbunden ist eine höhere Komplikationsrate im Vergleich zur Nd:YAG-Laserbehandlung (Shah et al. 1986, Olsen et al. 2000). Das Risiko einer Netzhautablösung lag dabei bei 3%, das eines zystoiden Makulaödems bei 2%. Eine weitere Methode ist die Nachstarabsaugung. Bei diesem Verfahren erfolgt die Politur der Hinterkapsel ohne deren Eröffnung. Die Komplikationsrate ist ähnlich gering wie bei der Nd:YAG-Laser-Kapsulotomie. Jedoch ist das Risiko der intraokularen Blutung oder Entzündung sowie der Kapselruptur gegeben, da auch bei diesem chirurgischen Verfahren der Bulbus eröffnet wird. Außerdem muss von einer hohen Rezidivrate ausgegangen werden, da weiterhin LEZ im Kapselsack verbleiben.

1.5 Prävention des Nachstars

1.5.1 Chirurgischer Ansatz

Zur Nachstarminimierung sollten in erster Linie die unter 1.3.2 genannten Faktoren beachtet werden.

Maloof und Mitarbeiter (2003) entwickelten jüngst das sogenannte „sealed-capsule irrigation system“, mit dem der Kapselsack selektiv gespült werden kann, ohne dass umliegende Strukturen mit der Spülflüssigkeit in Kontakt kommen. Hierdurch sollen möglichst komplett, aber dennoch selektiv, alle LEZ im Kapselsack inhibiert werden. Vor allem in Hinblick auf eine intraoperative Anwendung eventueller toxischer Substanzen zur LEZ-Hemmung scheint dieser Ansatz wegweisend.

1.5.2 Mechanisch-physikalischer Ansatz

Zum einen sollten die unter 1.3.3 aufgeführten Faktoren bei der Wahl der IOL berücksichtigt werden, zum anderen muss eine scharfe Optikkante als Standard gefordert werden, um eine langfristige Reduktion der Nachstar-Inzidenz sicherzustellen. Zusätzlich scheint der Ansatz von Nishi et al. (1998b) mit einem Kapselknickring sinnvoll. Klinische Untersuchungen legen eine Nachstar-hemmende Wirkung nahe (Menapace et al. 1999, Nishi et al. 2001a, Klemen 2002, Dick 2005). Crowstone und Mitarbeiter (2004) erzeugten die Lyse von LEZ durch Anwendung destillierten entionisierten Wassers in Verbindung mit dem „sealed-capsule irrigation system“ (Maloof 2003). Bretton et al. (2002) wiesen in tierexperimentellen Studien

eine Nachstar-Inhibition mittels bipolarer Diathermie nach. Joussen et al. (2001) zeigten einen inhibitorischen Effekt von niedrigdosierter β -Bestrahlung auf.

1.5.2.1 Der Kapselspannring

Klinische Ergebnisse zeigen eine inhibitorische Nachstarwirkung (Menapace et al. 1999, Dick 2005, Nishi et al. 2001a). Nishi et al. (1998) entwickelte 1997 einen speziellen Kapselspannring mit folgenden Eigenschaften:

1. rechteckiger Querschnitt
2. 0,7 mm Höhe
3. möglichst scharfkantiges Profil.

Der Grundgedanke bestand in der Verlagerung der Kapselkantung in die äußerste Peripherie des Kapselsacks und, damit verbunden, in der Freihaltung der Hinterkapsel von LEZ-Regeneraten auch außerhalb der Optikkante. Außerdem soll eine Fibrose-bedingte Eintrübung des vorderen Kapselblattes vermieden werden, indem eine Kontaktaufnahme zur Optikvorderfläche verhindert wird (Distanzeffekt). Aufgrund der zusätzlichen Kosten für den Kapselspannring und der verlängerten Operationszeit konnte sich das routinemäßige Implantieren eines Kapselspannringes nicht durchsetzen.

1.5.3 Pharmakologischer Ansatz

Seit den 1980er Jahren bestehen Bestrebungen, die Migration und Proliferation von Linsenepithelzellen durch Applikation pharmakologischer Substanzen zu hemmen. Dabei kamen bisher Zytostatika, steroidale und nichtsteroidale Antiphlogistika, Adhäsionshemmstoffe, Heparin, Lidocain, Suramin, Immunotoxine, photodynamische Therapieansätze und osmotisch wirksame Substanzen zur Anwendung (Rabsilber und Auffarth 2006). Die Versuche gehen auch dahin, geeignete Trägermaterialien zu entwickeln, um eine längere Freisetzung und Wirkdauer zu gewährleisten (Auffarth et al. 2005). Bislang ist eine klinische Anwendung der meist zellschädigenden Substanzen schwierig, da eine selektive Wirkung auf LEZ nicht gewährleistet ist und eine Schädigung des umliegenden Gewebes berücksichtigt werden muss.

Linsenepithelzellen durchlaufen eine phasenhafte Veränderung bis zur Ausbildung eines Visus-relevanten Nachstars: Adhäsion, Migration, Proliferation, Differenzierung

(Kojetinsky et al. 2001). Jede einzelne Phase kann dabei Angriffspunkt der verschiedenen Substanzen sein. In vielfachen laborexperimentellen und tierexperimentellen Versuchen wurde deren Wirksamkeit nachgewiesen. Bislang liegen nur einige wenige klinische Studien vor, da meist die Wirksamkeit zu gering war bzw. es zu einer Schädigung des umliegenden Gewebes kam.

Zytostatika und Antimitotika

Die Klasse der zytostatischen Substanzen ist am besten untersucht. Es zeigte sich ein Einfluss auf die Migration, Proliferation und Differenzierung der LEZ. Zudem konnte eine sehr effektive Nachstarprävention nachgewiesen werden.

5-Fluorouracil (5-FU) in einer Konzentration von 30 µg/ml (Fernandez et al. 2004, Ismail et al. 1996), Methotrexat (Hansen et al. 1987) und Arabinosylcytosin in einer Konzentration von 100 ng/ml (McDonnell et al. 1988) vermindern durch ihren Einbau in die DNA bzw. RNA deren Synthese. Mitomycin C (Fernandez et al. 2004, Inan et al. 2001, Inan et al. 2001, Ismail et al. 1996) führt durch DNA-Alkylierung zur Synthesehemmung. Daunomycin (10 ng/ml) (Hartmann et al. 1989, Hartmann et al. 1990, Weller et al. 1988) und Daunorubicin (Tetz et al. 1996) interkalieren in die DNA, blockieren die Matrizenfunktion und hemmen somit die DNA-/RNA-Synthese. Colchicin (15 ng/ml) (Legler et al. 1993, McDonnell et al. 1988), ein Mitosespindelgift, verhindert die Nachstarbildung durch Hemmung der zellulären Mikrotubuli. Der Nachteil dieser Substanzklasse ist die toxische Wirkung auf umliegendes Gewebe. Eine beträchtliche Schädigung des Hornhautendothels, der Iris, des Ziliarkörpers, der Retina sowie eine zytotoxische Wirkung auf das retinale Pigmentepithel sind beschrieben (Inan et al. 2001, Tetz et al. 1996, Weller et al. 1987).

Nichtsteroidale und steroidale Antiphlogistika

Nichtsteroidale und steroidale Antiphlogistika führen zu einer geringeren Inhibitionsrate der Zellproliferation als antimitotische bzw. adhäsionshemmende Substanzen. Indomethazin (Nishi et al. 1995) und Diclofenac (Cortina et al. 1997, Inan et al. 2001, Nishi et al. 1995) sowie Dexamethason (Inan et al. 2001, Mansfield et al. 2004, McDonnell et al. 1988) zeigten in-vitro eine Nachstarhemmung. In der klinischen Anwendung (ausschließlich lokale Applikation) fand sich jedoch keine Nachstar-reduzierende Wirkung. McDonnell und Mitarbeiter (1988) untersuchten die

Wirkung von Dexamethason in einer Konzentration von 100 µg/ml und erzielten dabei eine 50%ige Nachstarreduktion.

Adhäsionshemmung

Die Adhäsion der Zellen wird über Integrinrezeptoren reguliert. Integrine sind transmembrane Moleküle für die Zelladhäsion, die Heterodimere darstellen und an spezifische Liganden der extrazellulären Matrix binden. Das Disintegrin Salmosin hemmt die Zelladhäsion sowie LEZ-Migration und -Proliferation (Kim et al. 2002). RGD-Peptide hemmen die Anlagerung der LEZ an die Basalmembran des Kapselsackes und induzieren somit deren Apoptose. Sie zeigten in zahlreichen Untersuchungen nur geringe Nebenwirkungen (Inan et al. 2001, Kojetinsky et al. 2001, Nishi et al. 1997, Oharazawa et al. 2005, Pandey et al. 2002). Proteolytische Enzyme wie Trypsin (Humphry et al. 1988) und Dispase (Nishi et al. 1993) sowie EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure) lösen Zellkontakte und erleichtern somit die intraoperative mechanische Entfernung der Linsenepithelzellen. EDTA-induzierte Adhäsionshemmung und die dadurch bedingte Inaktivierung des Integrins ist auf die Kalziumbindung zurückzuführen (Fernandez et al. 2004, Humphry et al. 1988, Nishi et al. 1993, Nishi et al. 1996, Nishi et al. 1997).

Kalziumantagonisten

Die Proliferationshemmung und Beeinflussung der LEZ-Morphologie sind ursächlich für die Nachstar-inhibitorische Wirkung der Kalzium-Antagonisten (Matsushima et al. 2004). Der T-Kalziumkanal-Antagonist Mibefradil führt sowohl zur Depolarisierung des Membranpotentials als auch zur reduzierten Integrinexpression und bedingt folglich eine Adhäsionshemmung sowie eine Apoptoseinduktion (Beck et al. 2000, Beck et al. 2001, Beck et al. 2002, Nebe et al. 2004). Tetrandrin beeinflusst L-Typ-Kalziumkanäle. Daneben fand sich eine antiproliferative, antientzündliche, immunsuppressive, antikarzinogene Wirkung. Die subkonjunktivale Applikation induzierte eine statistisch signifikant geringe Nachstarbildung (Lee et al. 2002).

Lidocain

Vagas et al. (2003) führte im Rahmen einer in-vitro-Studie die Hydrodissektion und die Spülung des Kapselsackes mit konservierungsmittelfreiem 1%igem Lidocain

durch. Das führte zu einer Reduktion der LEZ aufgrund eines direkt toxischen Effektes bzw. aufgrund des Verlustes von Zell-Zellkontakten.

Immunotoxine

Bretton und Mitarbeiter (1999) führten mit Polylysin-Saporin-Konjugaten Zellkulturversuche an bovinen LEZ durch. An Kaninchenaugen angewendet, führten die Polylysin-Saporin-Konjugate zu einer Zerstörung der LEZ-Struktur und damit zu einer verzögerten Nachstarentwicklung. B-FGF-Saporin zeigte eine Wachstums- hemmung boviner LEZ in-vitro (Mansfield et al. 2004). Chemisch bzw. genetisch hergestelltes FGF2-Saporin inhibiert das Zellwachstum nach Injektion in den Kapselsack von Kaninchenaugen (Behar-Cohen et al. 1995). Sigma-1-Rezeptor- Antagonisten hemmen die Proliferation von hLEZ in-vitro (Wang et al. 2005). Für MDX-RA konnten Clark et al. (1998) die Wirksamkeit in Zellkultur-Versuchen und klinischen Studien nachweisen. Dabei war es effektiv Nachstar-hemmend und sicher in der intraokularen Anwendung (Meacock et al. 2000). Ricin A wirkt über einen antiproliferativen Effekt Nachstar-hemmend (Tarsio et al. 1997). Monoklonale Antikörper gegen humanes Transferrin (Davidson et al. 1998) sowie Antitransferrin- Rezeptor-Immunotoxine (Goins et al. 1994) hemmen die Zellproliferation.

Osmotisch wirksame Substanzen

Greite et al. (1990) untersuchten die Wirkung einer Osmolavage des Kapselsackes mit destilliertem Wasser. Diese führte zu einer 50%igen Verringerung des Zellproteins. 30% Alkohol in Aqua dest. und 0,01% n-Dodecylsulfat-Na-Salz führen zu einer stärkeren zellschädigenden Wirkung. Außerdem werden sie schneller neutralisiert als Zytostatika. Maloof et al. (2003) und Crowston et al. (2004) zeigten in ihren Arbeiten, dass nach 2-3 Minuten unter Einfluss von destilliertem Wasser LEZ in-vitro abgetötet werden konnten. Die Wirksamkeit von destilliertem Wasser auf LEZ wurde in tierexperimentellen Versuchen bestätigt (Fernandez et al. 2004). Hunold et al. (1991) wiesen in-vitro eine effektivere Zellschädigung durch Linsenepithel- Nekrosefaktoren als durch Aqua bidest. nach.

Photodynamische Therapieansätze

Phthalozyanin (Wong et al. 2004) und Bacteriochlorin (van Tenten et al. 2001) sowie Indocyanin-Grün (Melendez et al. 2005) führten unter in-vitro Bedingungen nach

Lichtexposition zu einer Suppression der Zellproliferation, während Trypanblau nur eine geringe Zelltoxizität zeigte (Melendez et al. 2005).

Weitere Substanzen

Zaturinsky et al. (1990) untersuchten die Wirkung von Heparin an Kaninchenaugen und fanden für die intrakamerale Applikation von Heparin eine 50%ige Nachstarreduktion. Die kombinierte Kältebehandlung der Hinterkapsel führte zu einer zusätzlichen Nachstarhemmung. Nach topischer Gabe von 5%igen Heparin-Augentropfen (AT) dreimal täglich über 12 Wochen fanden Xie et al. (2003) im Tierversuch eine Reduktion der Nachstarbildung. Klinische Studien zeigten bei topischer Applikation von Heparin-AT eine signifikant niedrigere Nachstarinzidenz und Nd:YAG-Laser-Rate (Mastropasqua et al. 1997). Rieck und Mitarbeiter (2004) fanden eine antiproliferative und migrationshemmende Wirkung von Sumarin durch Inhibition von Wachstumsfaktoren und Enzymen. Kaffeesäurephenethylester (CAPE)-Lösung (Hepsen et al. 1997) besitzt immunmodulatorische, antimitotische, antikarzinogene, antientzündliche sowie proliferationshemmende Eigenschaften, wobei die molekularen Grundlagen noch nicht vollständig geklärt sind. Synthetisch hergestellte Metalloproteinasen-Inhibitoren (Ilomastat) zeigten eine Nachstarreduktion durch Migrationshemmung und Kapselsackkontraktion (Wong et al. 2004). In der Zellkultur zeigte Benzalkoniumchlorid (Goto et al. 2003) eine zellschädigende Wirkung. Minoxidil hemmt die Lysylhydroxylase und beeinflusst somit die Kollagensynthese (Ishida et al. 2001). Tranilast-Augentropfen führen über eine Hemmung der Kollagensynthese zur Proliferationshemmung und damit zu einer signifikanten Nachstarreduktion (Tobari et al. 1999). Die Nachstarprävention durch eine intrakapsuläre Anwendung von Retinolsäure an Kaninchenaugen erwies sich ebenso als Nachstar-präventiv (Inan et al. 2001). Glaesser und Iwig konnten anorganisches Adeninphosphat aus bovinem Serum isolieren. In Zellkultur führte es zu einer Hemmung der Proteinsynthese und zu einer Reaktivierung von LEZ (Glaesser et al. 1990). Das pflanzliche Produkt Pirenoxin (Catalin) führte nach Applikation an Kaninchenaugen zu einer geringeren Nachstarausbildung (Biswas et al. 1999).

Freisetzungssysteme

Um die Problematik der kurzen, häufig nicht ausreichend langen Wirkzeit der verschiedenen Substanzen zu lösen, bestehen Bestrebungen, sogenannte Freisetzungssysteme zu entwickeln, die den Wirkstoff kontinuierlich abgeben. Oft wurde hierfür ein IOL-gebundenes System verwendet (Agarwal et al. 2003, Auffarth et al. 2005).

Tetz et al. (1996) implantierten IOL in Kaninchenaugen, die Daunorubicin bzw. Indomethacin freisetzen. Beide induzierten Komplikationen. Daunorubicin zeigte dabei jedoch eine statistisch signifikante Nachstarreduktion. Nishi et al. (1995) implantierte im Tierversuch 1%ige indomethacinbeschichtete IOL. Wesendahl et al. (1996) verwendete spezielle expandierbare Hydrogel-IOL, die in ihrem Polymernetzwerk mit verschiedenen Substanzen beladen wurden. Chirila et al. (1995) benutzten melaninhaltige Hydrogellinsen. Auch die Implantation von Perfluorcarbon-beschichteten IOL (Auffarth et al. 2002) zeigte keine signifikante Reduktion. Hingegen führten Polymethylmethacrylat (PMMA)-Linsen, beladen mit Thapsigargin (Duncan et al. 1997), ebenso wie FGF2-Saporin-beladene PMMA-IOL mit Heparin-Oberflächenmodifizierung (Behar-Cohen et al. 1995) und Mibefradil-beschichtete PMMA-Linsen (Beck et al. 2002) zu einer Proliferationshemmung. Pandey und Mitarbeiter (2002) untersuchten die Wirkung von 5-Fluorouracil-modifizierten Kapselspannringen im Tierversuch, führten jedoch die Nachstarreduktion auf eine mechanisch bedingte Migrationsblockade zurück. In Kaninchenaugen implantierte Colchicin-freisetzende Polymermatrixscheiben zeigten eine gute Nachstar-Reduktion, waren jedoch in höherer Konzentration mit Nebenwirkungen behaftet (Legler et al. 1993). Xie et al. (2003) untersuchten Heparin-Freisetzungssysteme an Kaninchenaugen und verwendeten dafür ein Poly-(lactid-co-glycolid) als Trägerpolymer. Verglichen wurden die subkonjunktivale Implantation und die Implantation in die Hinterkammer mit der topischen Applikation von Heparin-Augentropfen. Die beste Nachstarreduktion und höchste Kammerwasserkonzentration wurde mit nur sehr geringen Nebenwirkungen bei der intraokularen Implantation erzielt.

In in-vitro-Untersuchungen konnten Latz et al. (2000) eine geringere Proliferation von LEZ auf PMA-basierten Copolymeren als auf dem PMMA-Homopolymer zeigen. Eine antiproliferative Wirkung wurde auch nach Bindung entsprechender Copolymere an

Silikonlinsen gefunden (Yammine et al. 2005). Dies scheint ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung neuer IOL mit Nachstar-inhibitorischer Wirkung, zu sein.

1.6 Bisherige Untersuchungsmethoden zur Nachstar-Evaluierung

1.6.1 In-vivo-Methode

Nachstarbedingte Beeinträchtigungen von Visus, Kontrastsehschärfe und Blendung sind klinisch bekannte Größen (Magno et al. 1997, Wilkins et al. 1996, Sunderraj et al. 1992, Knighton et al. 1985, Tan et al. 1998, Claesson et al. 1994, LeClaire et al. 1982, Westheimer u. Liang 1994). Jedoch sind Funktionseinschränkungen als Methode zur Nachstarevaluierung nicht geeignet (Tetz et al. 1997), da eine Vielzahl anderer Faktoren zu einer Funktionseinschränkung der oben aufgeführten Größen führen kann. Auch die Nd:YAG-Laser-Kapsulotomie-Rate ist kein ideales Werkzeug zur Evaluierung der Nachstar-Inzidenz, da sie direkt bzw. indirekt von der subjektiven Beeinträchtigung des Patienten, der Einstellung des behandelnden Augenarztes und von ökonomische Überlegungen abhängig ist (Tetz et al. 1997).

Kruger et al. (2000) benutzten zur subjektiven Nachstarbeurteilung an der Spaltlampe eine Einteilungsskala von 0-3 und differenzieren zwischen der zentralen 3 mm-Zone und der Peripherie sowie zwischen Fibrose und Elschnig-Perlen. Sellman u. Lindstrom (1988) verwendeten eine ähnliche 4-Punkte-Skala, an der sich andere Autoren orientierten (Oner et al. 2000, Winther-Nielson et al. 1998, Kucuksumer et al. 2000, Ober et al. 2000, Westling u. Calissendorf 1991, Legler et al. 1993, Malecaze et al. 1999, Hepsen et al. 1997, Odrich et al. 1985).

In anderen Untersuchungen diente der Grad der Funduseinsicht als Maß für die Nachstarausprägung (Legler et al. 1993, Prajna et al. 2000). Einige Autoren bedienten sich der Scheimpflug-Fotografie (Lasa et al. 1995, Hayashi 1998, Hayashi et al. 1998b, Hayashi et al. 1998c) zur Objektivierung der Nachstarbeurteilung. Die Methode beruht auf der Reproduzierbarkeit von Bildern, um somit die Nachstar-Evaluierung zu objektivieren und unabhängig vom Untersucher zu machen. Bislang fehlt jedoch der Nachweis, dass die Methode zur Beurteilung einer Nachstarprogression geeignet ist (Friedman et al. 1999).

Die Helligkeitsanalyse von digitalen Graustufen-Bildern (Wang u. Woung 2000) beruht auf der Festlegung einer bestimmten Helligkeitsgrenze, die einzelne Pixel als Nachstar- bzw. Nicht-Nachstar-Region klassifiziert. Wegen potenzieller Störfaktoren

wie unterschiedliche Beleuchtung, Funduspigmentierung oder Pupillenweite ist diese Methode unzuverlässig.

Friedman et al. (1999) kennzeichnete das Nachstar-Areal und bewertete den durchschnittlichen Dichtigkeitsgrad auf einer Graustufen-Skala von 0-4. Eine Abstufung der Dichtigkeit innerhalb eines Areals ist hierbei nicht möglich, so dass eine Nachstarprogression gegebenenfalls nicht sicher erkannt wird.

Tetz und Mitarbeiter (1997) entwickelten daher das so genannte EPCO-System. An digitalisierten Retroilluminationsfotos werden Nachstar-Areale unterschiedlicher Dichtegrade markiert und einem Skalenwert von 0-4 zugeordnet. Anschließend wird mittels einer Computersoftware ein Gesamtwert errechnet. Das EPCO-System gilt inzwischen als Standardverfahren in der Nachstar-Evaluierung (Aslam et al. 2005). Es zeigt, obwohl es sich um ein subjektives Verfahren handelt, eine gute Reliabilität und Reproduzierbarkeit (Tetz et al. 1996c, Nimsgern et al. 1999, Findl et al. 2003).

Rein objektive Verfahren beruhen auf der Grundlage automatisierter Strukturanalysen anhand speziell erstellter digitaler Retroilluminationsaufnahmen (Barman et al. 2000, Buehl et al. 2002a, Findl et al. 2003, Aslam et al. 2005). Neue objektive Methoden bedienen sich der optischen Kohärenz-Tomographie (OCT) zur Quantifizierung des Nachstars (Moreno-Montañès et al. 2005).

1.6.2 Post mortem-Methode

Anhand von Nachstarerhebungen an pseudophaken Autopsie-Augen (Apple et al. 1990, Apple et al. 2001) kann bei ausreichend hohen Fallzahlen eine Aussage bezüglich der Nachstar-Inzidenz unterschiedlicher Linsentypen getroffen werden. Die Nachstarrate wird hierbei in der Regel als Maß zugrunde gelegt. Zusätzlich können morphologische und histologische Untersuchungen durchgeführt werden.

1.6.3 Tierexperimentelle Methode

Um eine Aussage über die Nachstar-Inzidenz neuer IOL oder Pharmakologika zu machen, sind Tiermodelle unerlässlich. Hierbei kommen in der Regel 20-Wochen-alte Kaninchen zum Einsatz, da bei ihnen die Kapselsackgröße am ehesten dem Kapselsack eines humanen Erwachsenen Auges entspricht (Nagamoto u. Eguchi 1997). Bereits nach drei Wochen zeigen Kaninchenaugen eine signifikante

Nachstarausbildung sowie eine mögliche Inhibition des LEZ-Wachstums durch ein bestimmtes Linsenmodell oder Pharmakon (Pandey et al. 2002, Nishi et al. 2001, Vargas et al. 2002, Vargas et al. 2003). Zur Nachstarbewertung wird sowohl eine Fotodokumentation im Verlauf als auch nach Enukleation durchgeführt. Außerdem kann post mortem eine histopathologische Aufarbeitung der enukleierten Augen erfolgen.

1.6.4 In-vitro-Methode

1.6.4.1 Zellkultur-Versuche

Für Zellkultur-Versuche können sowohl humane LEZ als auch tierische LEZ, bestenfalls bovine LEZ, kultiviert werden. Da die äquatorialen LEZ die größte Proliferationsaktivität aufweisen, ist es am einfachsten, die komplette Linse bzw. die gesamte Linsenkapsel (Rieck et al. 2004) zu kultivieren. Jedoch sind hierfür Spenderbulbi erforderlich. Um unabhängig von Spendermaterial zu sein, kann für humane Zellkulturen das vordere Kapselhäutchen, das bei der Kapsulorhexis während der Katarakt-Operation präpariert wird (Ohara et al. 1992, Kojetinsky et al. 2001), gewonnen und kultiviert werden. Zellkulturen eignen sich besonders für Untersuchungen zur Wirkung pharmakologischer Substanzen sowie zur Erforschung molekularer Mechanismen der LEZ-Transdifferenzierung (Kim et al. 2004).

1.6.4.2 Modelle

In-vitro-Modelle sind nicht nur zum Studium von LEZ-Proliferationsprozessen dienlich, sondern auch zur Untersuchung von Wachstumsprozessen in Abhängigkeit einer IOL bzw. in Kombination mit einem Pharmakon sowie zur Beurteilung morphologischer Veränderungen des Kapselsackes selber.

McDonnell und Mitarbeiter (1985) präparierten die vordere Linsenkapsel boviner Linsen und ließen darauf LEZ von Kaninchenaugen auswachsen. Linnola et al. (1999) kultivierten ein epithelial-stromales Hornhautexzidat aus Kaninchenaugen auf einer IOL, um die Bioaktivität der entsprechenden IOL zu beurteilen. Oshika et al. (1998) simulierten an bovinen Kollagen-Typ-I-Platten die Adhäsionskraft unterschiedlicher IOL an die Linsenkapsel. Kurosaka et al. (2002) entwickelten ein

Modell zur quantitativen Untersuchung der LEZ-Migration in Abhängigkeit vom IOL-Typ.

Klinisch orientierte Modelle arbeiten mit kultivierten Kapselsäcken, denen vorher gegebenenfalls eine IOL implantiert worden ist. Nagamoto und Mitarbeiter (Nagamoto u. Hara 1996, Nagamoto et al. 1996, Nagamoto u. Eguchi 1997) kultivierten Kapselsäcke von Kaninchenaugen nach Implantation eines Kapselspannrings und einer Kunstlinse. Saxby und Mitarbeiter (1998) implantierten in humane Kapselsäcke von Spenderbulbi Silikonringe, nachdem sie eine Kapsulorhexis und eine Linsenextraktion vorgenommen hatten. Anschließend kultivierten sie den kompletten Kapselsack nach Exzision aus dem Spenderbulbi. El-Osta und Mitarbeiter (2003) fixierten aus Spenderaugen gewonnene Linsen mittels Gewebekleber in einer Halterung und führten dann eine Kapsulorhexis sowie eine Hydroexpression des Nukleus durch, abschließend wurde gegebenenfalls eine IOL implantiert. Liu und Mitarbeiter (1996) führten eine Linsenoperation mit IOL-Implantation an Spenderaugen vor Durchtrennung der Zonulafasern durch. Das gesamte Kapselsack-IOL-System wurde anschließend in einer Petrischale mit feinen Metallnadeln fixiert und kultiviert.

1.7 Anforderungen an ein ideales System zur Nachstaruntersuchung

Liekfeld (2006) formulierte folgende Bedingungen für ein ideales System:

1. kliniknahe Situation,
2. geringer zeitlicher Aufwand,
3. geringer Materialaufwand, geringe Anzahl von Augen,
4. prospektive Untersuchungsmöglichkeit,
5. vergleichende Untersuchungsmöglichkeit,
6. Möglichkeit zur Untersuchung von neuen - eventuell nicht zugelassenen - IOL,
7. Möglichkeit zur Untersuchung von Pharmaka (auch nicht zugelassenen),
8. Möglichkeit zur Untersuchung von chirurgisch-mechanischen Prozeduren,
9. selektive Untersuchungsmöglichkeit einzelner Variablen,
10. Möglichkeit zur morphologischen und histopathologischen Beobachtung,
11. gute Reproduzierbarkeit.

Die Nachstarentstehung bei Patienten nach Katarakt-Operation ist ein klinisches Problem. Demzufolge sollte ein Nachstar-Bewertungssystem der klinischen Situation möglichst nahe kommen.

Klinische Studien mit in-vivo-Untersuchungen haben einige generelle Nachteile. So sind häufig lange Beobachtungszeiträume von bis zu mehreren Jahren notwendig. Zudem bedürfen klinische Studien in der Regel großer Patientenzahlen und Untersuchungen bezüglich der Morphologie sind nur begrenzt möglich. Histopathologische Untersuchungen sind nicht möglich. Außerdem sind klinische Studien zur Untersuchung nicht zugelassener IOL bzw. Pharmaka nur schwer zugänglich.

Post mortem-Studien sind retrospektive Studien, die die klinische Situation gut widerspiegeln, jedoch auf entsprechend großen Fallzahlen beruhen sollten. Aussagen hinsichtlich der Morphologie und Histopathologie pseudophaker Augen (Marcantonio et al. 2000, Linnola et al. 2000) können in begrenztem Umfang getroffen werden. Der Untersucher ist aber bei diesem Studiendesign abhängig von der implantierten IOL. Untersuchungen neuer IOL oder Pharmaka sind nicht möglich. Tierexperimentelle Studien sind mit einem sehr hohen Aufwand verbunden. Gleichzeitig sind dabei die Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Kapselsack-verhältnisse (Nagamoto u. Eguchi 1997) nicht unbedingt auf humane Verhältnisse übertragbar.

In-vitro-Studien sind reine Zellkulturversuche und nur für pharmakologische Studien bezüglich Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung von Linsenepithelzellen geeignet (Kojetinsky et al. 2001, Rieck et al. 2004). Zur Testung IOL-abhängiger Faktoren sind Modelle notwendig, bei denen das gesamte Kapselsack-IOL-System betrachtet werden kann. Die bisher vorgestellten Modelle sind mehr oder weniger aufwendig und mehr oder weniger klinisch orientiert.

2. Ziel der experimentellen Arbeit

10-30% der Augen von Patienten, die sich einer Katarakt-Operation unterziehen, entwickeln innerhalb von ein bis fünf Jahren einen sogenannten Nachstar (Schaumburg et al. 1998). Der Erfolg einer Katarakt-Operation wird durch die Entstehung dieses Nachstars oft wieder in Frage gestellt. Um den Visus der Patienten wieder auf das postoperativ erreichte Niveau zu heben, wird der Nachstar heute überwiegend mittels Nd:YAG-Laser zentral eröffnet. Diese Behandlungsmethode birgt jedoch nicht unerhebliche Risiken und Kosten – ebenso wie die alternative Methode, die operative Nachstareröffnung. Es werden daher Möglichkeiten der Nachstarprävention gesucht.

Ausgangspunkt und Voraussetzung der Entstehung eines Nachstars ist die Adhäsion an der Kapsel und die Wanderung der Linsenepithelzellen aus der Äquatorialregion der Linsenkapsel. Nach einer Kataraktoperation im Kapselsack verbleibende Linsenepithelzellen adhären an der Kapsel und können durch Migration und Proliferation eine Nachstarmembran bilden. Vorangehende Arbeiten (Beck et al. 2000, Beck et al. 2001, Beck et al. 2002, Nebe et al. 2004) haben gezeigt, dass der T-Kalziumkanal-Antagonist Mibefradil in der Lage ist, Zelladhäsionen zu hemmen.

Unter Berücksichtigung der unter 1.7 erwähnten Vor- und Nachteile eines Systems zur Nachstarbeurteilung, vor allem auch in Hinblick auf die Untersuchung neuer experimenteller Ansätze zur Nachstarprävention, erscheint das von Saxby und Mitarbeitern (1998) vorgestellte Kapselsack-Modell als der vielversprechendste Ansatz. In der vorliegenden Arbeit wird die Anwendung und Modifikation eines solchen Modells vorgestellt. Aus der Literatur bekannte Ergebnisse dienen als Referenzen und werden berücksichtigt.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Evaluation eines in-vitro-Modells zur Simulation der Nachstar-Entwicklung in-vivo, das vor allem Aussagen über pharmakologische Ansätze zur Nachstarprävention zulässt sowie die konkrete Anwendung dieses Modells für den modifizierten T-Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil. Es soll der Effekt einer Langzeitinkubation mit wirkstoffbeladenen Polymeren auf die Adhäsion und Proliferation humaner Linsenepithelzellen beobachtet werden. Ziel ist es, experimentell zu untersuchen, inwieweit die Hemmung der Zelladhäsion durch den T-Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil auch klinisch zur Prävention des Nachstars nach Katarakt-Operation einsetzbar ist.

3. Material und Methoden

3.1 Das Mibefradil

Mibefradil (Abb. 3.1) gehört in die pharmakotherapeutische Gruppe der Kalziumkanal-Blocker. Mibefradil übt seine pharmakologische Wirkung durch die Modulation des transmembranären Einstroms von Kalziumionen aus. Mibefradil ist ein Kalziumantagonist, der selektiv die spannungsabhängigen T-Kanäle hemmt, die bereits bei niedrigen Spannungszuständen aktiviert werden und zusätzlich zur Hemmung spannungsabhängiger L-Kanäle mit hoher Aktivierungsschwelle führt. Die Metabolisierung von Mibefradil erfolgt auf zwei Arten: durch die Esterase-katalysierte Hydrolyse der Esterseitenketten in einen Alkoholmetaboliten und über Cytochrom-P450-katalysierte Oxidation, indem es das Cytochrom P450 3A4 hemmt. Mibefradil wird metabolisch inaktiviert und in Fäzes (75%) und Urin (25%) aus dem Blutkreislauf ausgeschlossen.

Die Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen haben gezeigt, dass der Kalziumantagonist Mibefradil die Adhäsion und damit gekoppelte Funktionen wie Proliferation und Lebensfähigkeit von hLEZ in der Kultur hemmt sowie Apoptose induziert (Beck et al. 2000, Beck et al. 2001, Beck et al. 2002, Nebe et al. 2004). Dabei konnten auch Hinweise über molekulare Mechanismen wie Reduktion der Integrin-Expression, Aufhebung der Integrin-Organisation, Fragmentierung des Zytoskeletts und Strukturänderung von exprimierten Matrixproteinen gewonnen werden (Beck et al. 2001). Proliferierende Zellen besitzen zudem eine größere Anzahl von T-Kalziumkanälen als nicht proliferierende Zellen (Wang et al. 2002, Schmitt et al. 1995). Proliferation wird nach heutigem Kenntnisstand bei einer Vielzahl von Zellsystemen über die Kalziumhomöostase und damit in gewisser Weise über das Membranpotential und damit auch über Kaliumkanäle beeinflusst (Neylon et al. 2002, Gavrilova-Ruch et al. 2002). Für eine normale Proliferation ist ein polarisierter Zustand, d. h. ein Membranpotential in Nähe des Kaliumgleichgewichtspotentials erforderlich.

Aus der Literatur und durch eigene Voruntersuchungen ist die optimale Konzentration für die Versuche mit 10 μ M Mibefradil anzusetzen. Die Wirkung des T-Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil wurde auf die unter 3.5, 3.6, 3.7, 3.8

beschriebenen Parameter in einem Konzentrationsbereich von 10 μM bis 30 μM sowie in unter 3.4 aufgeführten Zeiträumen untersucht.

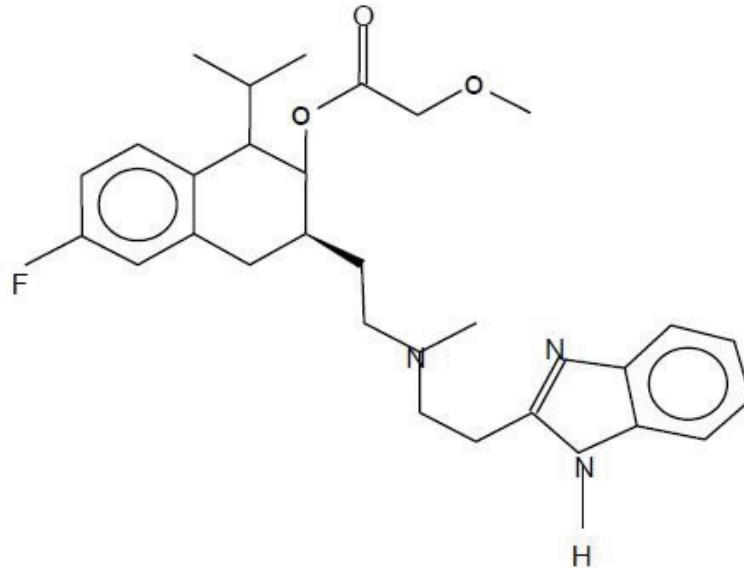


Abb. 3.1: Strukturformel des T-Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil: Acetic acid, methoxy-,2-[2-[[3-(1H-benzimidazol-2-yl)propyl]methylamino]ethyl]-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-(1-methylethyl)-2-naphthalenyl ester, (1S-cis)-; Molmasse: 568,55 g/mol.

3.2 Der Kapselspannring

Für alle Versuche verwendeten wir einen Kapselspannring ER11 aus hochreinem Polymethylmethacrylat (PMMA) der Firma *Acri.Tec (Abb 3.2). Der Durchmesser aller Kapselspannringe betrug kontrahiert 11,0 mm (11,13 mm x 13,22 mm [offen]), die Höhe 1,78 mm. Die Kapselspannringe wiesen zwei Positionierungslöcher mit einem Durchmesser von 0,4 mm auf.



Abb. 3.2: Kapselspannring ER11 der Firma *Acri.Tec.

3.3 Immobilisierung von gelöstem Mibefradildihydrochlorid und Kopplung an die Kapselspannringoberfläche (Machbarkeitsstudie)

Der generelle Ansatz für die pharmakologische in-vitro-Inhibition von hLEZ nach Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradildihydrochlorid bestand darin, die mit Mibefradil-beladenen Mikrokapseln in das Kapselsack-Modell einzugeben und die Wirkung des freigesetzten Mibefradils auf verbliebene hLEZ im Kapselsack nach simulierter „Open-sky“-Linsenextraktion zu untersuchen.

3.3.1 Solvent-Evaporation-Verfahren zur Herstellung von Mibefradil-beladenen Mikrokapseln

Das Verfahren der Lösungsmittelverdampfung (Solvent-Evaporation) wird zur Herstellung von wirkstoffbeladenen Nanopartikeln angewendet. Dabei wird der Wirkstoff in einem chlorierten organischen Lösungsmittel dispergiert. Die Dispersion wird anschließend in die wässrige Lösung des Polymers emulgiert. Das organische Lösungsmittel wird aus den dispergierten Tröpfchen bei reduziertem Druck entfernt, wobei das Polymer mit dem eingebetteten Wirkstoff ausfällt.

Es wurden sphärische Mikrokapseln mit einem Durchmesser von 20 µm bis 30 µm und einer Wirkstoffbeladung von 38 mg Mibefradil pro g Partikel nach dem Solvent-Evaporation-Verfahren unter Verwendung des biodegradierbaren Polyesters Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) der Molmasse 1700 g/mol hergestellt. Die Wirkstofffreisetzung wurde UV-spektroskopisch untersucht. Das polymere Matrixmaterial PLGA wurde zur Erzeugung reaktiver Bindungsstellen O-terminal über einen achttatomigen Spacer aminiert.

3.3.2 UV-Spektroskopie zur Untersuchung der Wirkstofffreisetzung

Durchläuft monochromatisches Licht die Lösung einer Substanz, die Licht der eingestrahnten Wellenlänge absorbiert, wird die Intensität des einfallenden Strahls abgeschwächt. Das Maß der Abschwächung ist die Extinktion. Die Abnahme der Extinktion ist proportional der Konzentration der Lösung. Auf diese Weise können Konzentrationen löslicher Substanzen gemessen werden. Das Absorptionsmaximum

von Mibefradil zeigt sich bei UV-Licht der Wellenlänge von 269 nm. Um die Mibefradilfreisetzung aus den Mikrokapiteln zu untersuchen, wurden jeweils 20 mg wirkstoffhaltige Kapiteln in 2 ml isotonischer Kochsalzlösung eingesetzt und die Wirkstofffreisetzung bei 37° C über 50 Tage UV-spektroskopisch bei 269 nm bestimmt.

3.3.3 Chemische Ankopplung von Mibefradil-beladenen Mikrokapiteln an die Kapitelspannringoberfläche

Zur chemischen Ankopplung der Mikrokapiteln an die Kapitelspannringoberfläche wurde der Kapitelspannring nach einer Glycidylmethacrylatoligomer-Befilmung mit einem Polymersol auf der Basis von Polymethylmethacrylat (PMMA) behandelt und nachfolgend direkt zur Bindung der Kapiteln eingesetzt. Die Linkerchemie zwischen der Spannringoberfläche und der Mikrokapitel basiert somit auf der Aminolyse von Epoxiden. Es wurde eine Beladung der Kapitelspannringe mit einer Konzentration von 2,8 mg bzw. 4,5 mg Mibefradil erreicht (Abb. 3.3).

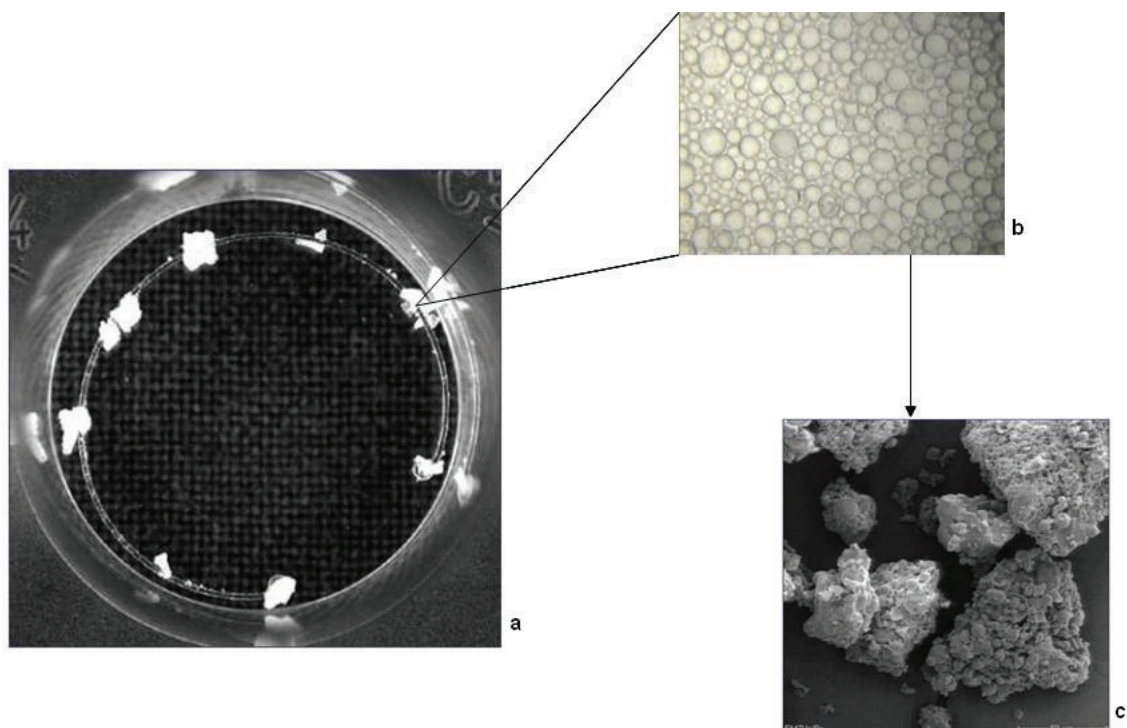


Abb. 3.3: Makroskopische Aufnahme eines mit Mibefradil-Mikrokapiteln beladenen Kapitelspannrings im Well (a); durchlichtmikroskopische Aufnahme (40-fache Vergrößerung) von Mikrokapiteln (b); rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (50-fache Vergrößerung) von Mikrokapiteln (c).

Dazu wurden die Kapselspannringe zweimal mit 0,1 M Methylmethacrylat und 0,1 M Methacrylsäureglycidylester in 5 ml Ethanol für 5 Minuten behandelt, anschließend bei Raumtemperatur für 10 Minuten getrocknet und abschließend mit den PLGA-Kapseln für weitere 10 Minuten inkubiert.

3.4 Das Kapselsack-Modell

3.4.1 Präparation und Kultivierung der humanen Kapselsäcke

Nach Entfernung der Korneoskleralsegmente für die Hornhauttransplantation wurden die humanen Kapselsäcke aus Spenderbulbi der Hornhautbank der Univ.-Augenklinik Rostock gewonnen. Im Anschluss wurde an dem im Bulbushalter liegenden Spenderbulbus unter dem Mikroskop (Carl Zeiss OPMI CS) eine „Open-sky“-Katarakt-Operation (Abb. 3.4) simuliert.

Dabei wurde zunächst die Iris mit der Pinzette entfernt, um einen freien Blick auf die Linse zu haben. Danach erfolgte eine große zentrale Rhexis (CCC-Methode; Neuhann 1987) mit der Rhexispinzette (nach Utrata). Der Nukleus wurde anschließend per Hydrodissektion mit einer ophthalmologischen Spüllösung über eine Kanüle exprimiert. Verbliebene Linsenfasern wurden abgesaugt und die Linsenkapsel durch sorgfältiges Spülen („Hydrojet“) poliert. Im nächsten Schritt erfolgte die Implantation der Kapselspannringe mit der Implantationspinzette (nach Doden) ohne Zuhilfenahme eines Viskoelastikums in den Kapselsack. Abschließend wurde das gesamte Kapselsack-Kapselspannring-System nach Durchtrennung der Zonulafasern mit der Schere freipräpariert und in eine mit 1 ml Medium gefüllte PMMA-12-well-Zellkulturplatte (Cellstar®, Greiner Labortechnik, Kremsmünster; Austria) gegeben (Abb. 3.5), so dass die Rhexisöffnung auf den Boden zeigte (dadurch sollte vor allem die Hinterkapsel zuverlässig ausgespannt werden).

Die Kultivierung der Kapselsäcke erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe; Deutschland) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und einem Zusatz von 50 mg Gentamycin/l (entspricht 1%). Die Kulturen wurden bei einer Temperatur von 37° C sowie bei 5% CO₂-Gehalt der Luft im Brutschrank inkubiert. Auf einen Wechsel des Kulturmediums wurde verzichtet, um die Wirkstoffkonzentration nicht zu beeinflussen.

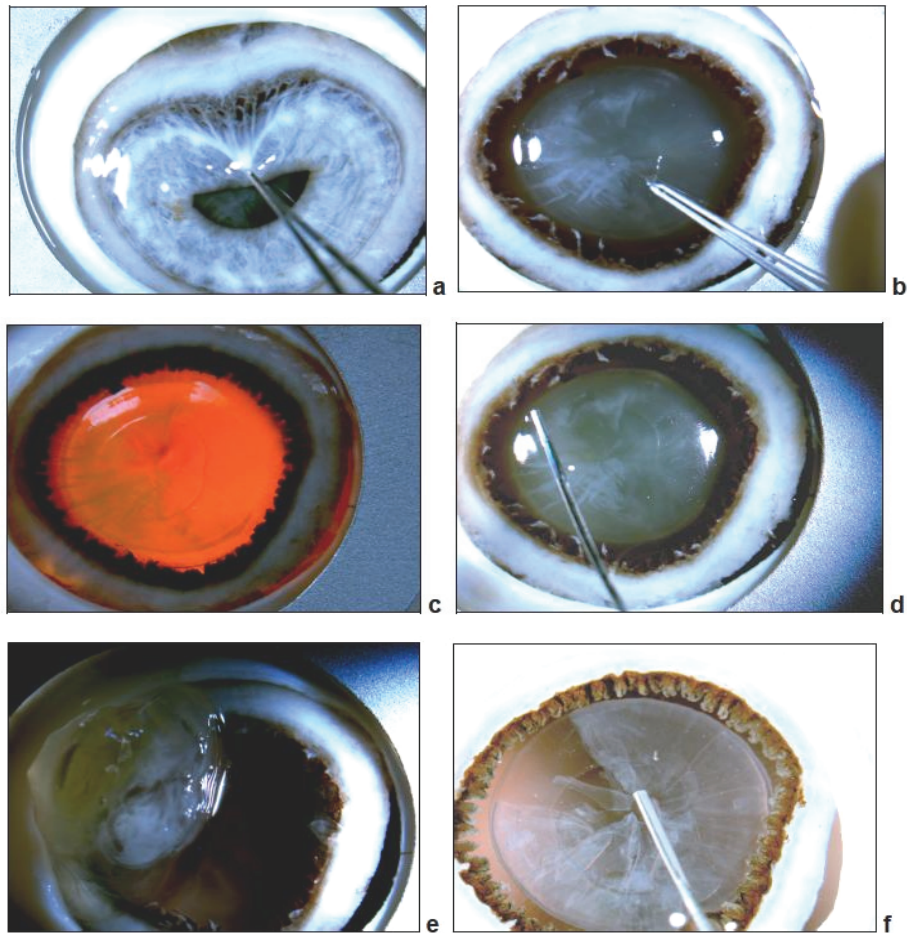


Abb. 3.4: Präparation der humanen Kapselsäcke im Sinne einer „Open-sky“-Katarakt-Operation nach Entnahme der Korneoskleralsegmente: Iridektomie (a); Präparation der Rhexis (b), zirkuläre Rhexis im regredienten Licht (c); Hydrodissektion (d) und –expression des Nukleus (e); Aspiration der Linsenfasern (f).

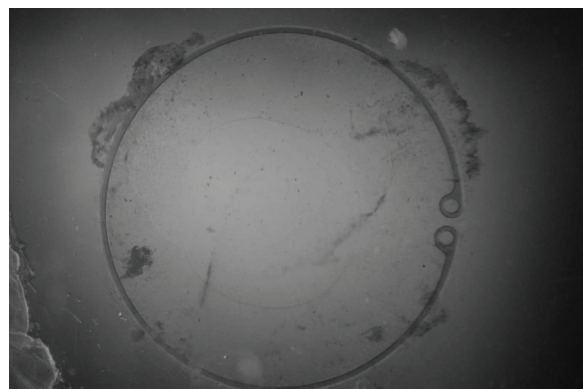


Abb. 3.5: Makroskopische Aufnahme des humanen Kapselsackmodells in toto und in Zellkultur nach Implantation des Kapselspannrings, Durchtrennung der Zonulafasern und Explantation aus dem Spenderbulbus.

Bei den Versuchsreihen wurden jeweils Bulbuspaare eines Spenders verwendet. Damit fielen patientenabhängige Faktoren wie Alter oder systemische Erkrankungen für die Beurteilung nicht ins Gewicht, da Paarvergleiche angestellt wurden. Insgesamt wurden 14 Kapselsäcke von 7 Bulbuspaaren untersucht.

Das Verhalten humaner LEZ in post mortem entnommenen Kapselsäcken wurde nach erfolgter Linsenextraktion und Installation des T-Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil untersucht. Aus der Literatur und durch eigene Voruntersuchungen (Beck et al. 2000, Beck et al. 2001, Beck et al. 2002, Nebe et al. 2004) ist die optimale Konzentration für die Versuche mit 10 μ M Mibefradil anzusetzen. Die Wirkung des T-Kalziumkanal-Antagonisten wurde in einem Konzentrationsbereich von 10 μ M bis 30 μ M untersucht.

Dabei wurde der Wirkstoff Mibefradil als immobilisiertes Mibefradil, wie unter 3.3 ausgeführt, in freier Form sowie in gebundener Form an einen Kapselspannring untersucht.

Um die Wirkung einer Inkubation der hLEZ mit dem T-Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil auf deren Verhalten hinsichtlich Zellwachstum und -morphologie, metabolischer Aktivität, Vitalität und Veränderungen der Mikrofilamente zu untersuchen, erfolgten die Analysen nach $12 \pm 0,69$ Tagen.

In jedem Versuchsansatz wurden humane Kapselsäcke - wie oben beschrieben - verwendet. Bei den Versuchsreihen wurden jeweils Bulbuspaare eines Spenders verwendet. Dabei diente der Kapselsack des rechten Spenderbulbus stets als Kontrolle. Dem Kapselsack des linken Spenderbulbus wurde je nach Ansatz 10 μ M, 20 μ M bzw. 30 μ M Mibefradil zugegeben bzw. während der Präparation der modifizierte Kapselspannring implantiert. Die Kultivierung erfolgte in 12-well-Zellkulturplatten mit jeweils 1 ml Kulturmedium.

Um die Wirkung einer permanenten Inkubation der hLEZ mit dem T-Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil auf deren Verhalten hinsichtlich Zellwachstum und Morphologie zu beurteilen, erfolgte täglich die mikroskopische Untersuchung der Zellen sowie zu definierten Zeitpunkten (3. Tag, 6. Tag, 9. Tag, 12. Tag). Hinsichtlich der metabolischen Aktivität, Vitalität und Veränderungen der Aktinstruktur erfolgte die Beurteilung der hLEZ stets am Ende des Beobachtungszeitraumes, also nach Ausbilden eines konfluenten Zellrasens ($12 \pm 0,69$ Tage) der entsprechenden Kontrolle.

3.5 Beobachtung und Messung des Wachstums von humanen Linsenepithelzellen unter permanentem Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten

Das Ausbreiten der Zellen im Kapselsack ist ein aktiver Prozess. Um den Einfluss des Kalziumantagonisten zu untersuchen, wurden die Kapselsack-Kapselspannringsysteme, wie unter 3.4.1 beschrieben, präpariert und mit dem T-Kanalblocker inkubiert.

Mittels Durchlichtmikroskopie (Nikon TMS-F) wurden die kultivierten Kapselsäcke täglich mikroskopisch beurteilt sowie eine entsprechende Fotodokumentation durchgeführt (Abb. 3.6). Außerdem wurden bei einigen Versuchsreihen zu festgelegten Zeitpunkten (3. Tag, 6. Tag, 9. Tag, 12. Tag) digitale Übersichtsaufnahmen mit definierter Vergrößerung (4-fach) angefertigt und das Zellwachstum der behandelten Kapselsäcke mit dem Wachstum hLEZ unbehandelter Kapselsäcke subjektiv verglichen.

Die Beobachtung des hLEZ-Wachstums auf der Hinterkapsel erfolgte bis zu dem Zeitpunkt, an dem sich ein kompletter Zellrasen ausgebildet hatte. Endpunkt für alle Versuchsreihen war die Ausbildung eines hLEZ-Monolayers auf der Hinterkapsel der Negativkontrolle.

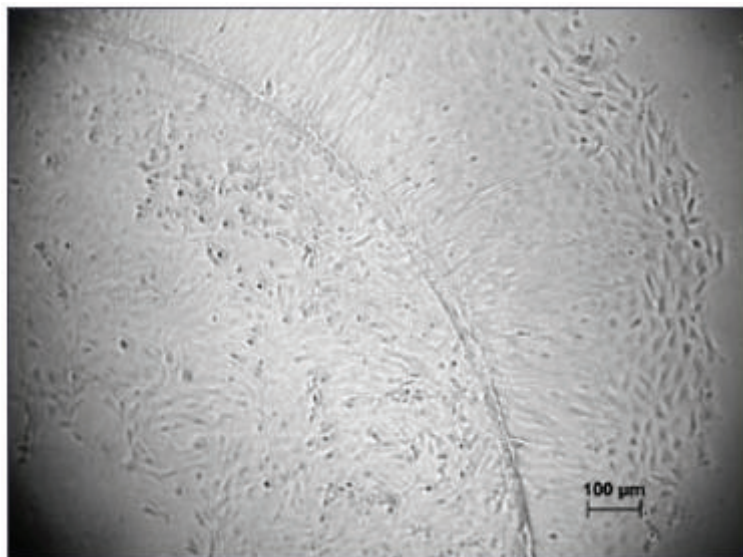


Abb. 3.6: Mikroskopisches Bild vom hLEZ-Monolayer im Kapselsack-Modell, 4-fache Vergrößerung.

3.6 Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten auf die metabolische Aktivität humaner Linsenepithelzellen

Eine geeignete Methode zum quantitativen Nachweis der Zellproliferation vitaler primärer humaner Linsenepithelzellen stellt die spektrofotometrische Absorption mittels ELISA Reader dar. Die gemessene Extinktion ist direkt proportional zur metabolischen Aktivität. Für die Bestimmung der metabolischen Aktivität wurde das Cell Proliferation Kit I [MTT] (Fa. Roche, Penzberg; Deutschland) verwendet.

Der Test basiert auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan durch metabolisch aktive Zellen (Abb. 3.7). Die Reduktion ist hauptsächlich von den pyridinhaltigen Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH abhängig. Die Reduktion von MTT durch NADH und NADPH ist abhängig von Enzymen des endoplasmatischen Retikulums. Die Menge des umgesetzten und letztendlich gemessenen Farbstoffs entspricht damit der Glykolyserate der Zellen per se.

Um die Wirkung einer Inkubation der hLEZ mit dem T-Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil auf deren Verhalten hinsichtlich ihrer metabolischen Aktivität zu bestimmen, erfolgten die Untersuchungen in der Zellkultur.

Für die Gewinnung von primären humanen Linsenepithelzellen wurde Kapsulorhexismaterial während der Kataraktchirurgie entnommen und in eine 48-well-Zellkulturplatte überführt. Die Kultivierung erfolgte in 100 µl Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe; Deutschland) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und einem Zusatz von 50 mg Gentamycin/l (entspricht 1%). Die Kulturen wurden bei einer Temperatur von 37° C sowie bei 95% O₂- und 5% CO₂-Gehalt der Luft im Brutschrank inkubiert. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle 6 Tage. Nach durchschnittlich 20 Tagen Kultivierung wurden 10 µM Mibefradil bzw. 20 µM Mibefradil bzw. 30 µM Mibefradil zugegeben. Zu diesem Zeitpunkt bestand ein subkonfluenten Zellrasen. Die Analyse erfolgte nach einer 24-stündigen Inkubation.

Nach Abschluß der Inkubationsperiode wurde das Kulturmedium abpipettiert, verworfen und MTT in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml zugegeben.

Die Zellkulturen wurden zunächst für 4 Stunden mit MTT im Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C sowie bei 5% CO₂-Gehalt der Luft inkubiert. Anschließend

wurden die Zellkulturen über Nacht mit der Solubilisierungslösung [Menge abhängig vom festgelegten Endvolumen] im Brutschrank bei gleichen Bedingungen inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte in einer micro-(96 well-)Zellkulturplatte unter Verwendung des ELISA Readers bei einer Wellenlänge von 550-600 nm gegen eine Referenzwellenlänge von > 650 nm.



Abb. 3.7: Mikroskopisches Bild des blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan nach Reduktion von MTT in den hLEZ, 10-fache Vergrößerung.

3.7 Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten auf die Vitalität humaner Linsenepithelzellen

Für die Untersuchung der Zellvitalität wurde das LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Assay Kit (L-3224) (Fa. Molecular Probes, Inc., Eugene; U.S.A.) verwendet.

Die Darstellung der Vitalität hLEZ basiert auf dem simultanen Nachweis lebender Zellen mittels Calcein AM und toter Zellen mittels Ethidium Homodimer durch die Fluoreszenzmikroskopie. Lebende Zellen sind durch zwei Parameter gekennzeichnet: zum einen durch die intrazelluläre Esteraseaktivität und zum anderen durch eine integre Plasmamembran. Nicht-fluoreszierendes Calcein AM wird dabei über die intakte Zellmembran lebender Zellen in das Zytoplasma aufgenommen und bis in die Zellfortsätze verteilt. Durch die unspezifische Esterase erfolgt die Umwandlung in fluoreszierendes Calcein. Unter Blaulichtanregung (ex/em ~495 nm/~515 nm) zeigt sich eine intensive Grünfärbung des Zytoplasmas und somit der Nachweis vitaler Zellen. Ethidium Homodimer gelangt nur durch eine defekte Zellmembran in die Zelle und bindet dort an die Nukleinsäure des Kerns. Unter Blaulichtanregung (ex/em ~495 nm/~635 nm) zeigt sich die rote Kernfluoreszenz geschädigter und toter Zellen.

Zur Färbung wurde das Zellkulturmedium vollständig abpipettiert und verworfen und die Kapselsäcke mit je 1 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) zweimal gespült. Nach Abziehen des PBS wurden die Kapselsäcke mit einer Lösung aus 4 μ M Ethidium Homodimer und 8 μ M Calcein AM für 20 Minuten inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationsphase wurde die Lösung abpipettiert und verworfen. Die anschließende Fluoreszenzbetrachtung erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie (LSM-410, Carl Zeiss).

3.8 Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten auf das Aktinzytoskelett in humanen Linsenepithelzellen

Grundsätzlich gliedern sich die Zellen aller Wirbeltiere, demnach auch die Zellen des Menschen, in Zellkern (Nukleus) und Zelleib (Zytoplasma). Charakteristischer Zytoplasmabestandteil aller eukaryonten Zellen bildet das Zytoskelett, bestehend aus den Mikrotubuli, Mikrofilamenten (Aktinfilamente) und intermediären Filamenten. Die Komponenten des Zytoskeletts fügen sich zu einem hochstrukturierten, dynamischen, zytoplasmatischen Netzwerk (Abb. 3.8) zusammen, das für die Gestalt der Zelle, für Bewegungsvorgänge und für den intrazellulären Transport zentrale Bedeutung hat. Bei den Aktinfilamenten handelt es sich um sehr feine, einzeln gelegene, vernetzte oder gebündelte Fäden (Durchmesser des Einzelfilaments 5-7 nm). Jedes Aktinfilament besteht aus zwei helikal umeinander gewundenen Aktineinzelfäden. Die Stellung der Aktinfilamente zueinander kann sich funktionellen Anforderungen anpassen und ist bestimmt durch aktinbindende Proteine. Den Aktinfilamenten sind aktinbindende Proteine zugeordnet, die der Verknüpfung der Aktinfilamente untereinander dienen.

Die Analyse der Aktinzytoskelett-Struktur erfolgte hinsichtlich einer Aktin-Fragmentierung mittels konfokaler Mikroskopie (LSM-410, Carl Zeiss). Nach zweimaligem Spülen mit 1 ml PBS und Fixierung der hLEZ unter Zugabe von 100 μ l Paraformaldehyd (PFA) 4% in die Kapselsäcke für 10 Minuten sowie erneutem Spülen mit 1 ml PBS erfolgte die Permeabilisierung mit 100 μ l Triton 0,1% für weitere 10 Minuten. Dem schloss sich ein erneutes Spülen mit 1 ml PBS an. Danach wurden zur Färbung der hLEZ die Kapselsäcke mit 50 μ l Phalloidin Trite für 30 Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Kapselsäcke nochmals mit 1 ml PBS gespült und mit Einbettmedium fixiert.

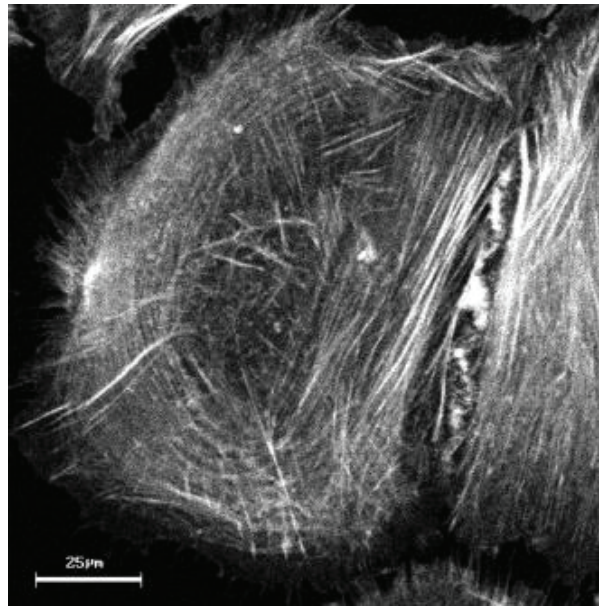


Abb. 3.8: Mikroskopischer Aspekt des Aktinzytoskeletts humaner Linsenepithelzellen (Universität Rostock, Zellbiologie).

3.9 Statistische Auswertung

Bei den experimentellen Versuchsreihen im Kapselsack-Modell wurden jeweils Bulbuspaare eines Spenders verwendet, um Paar-Vergleiche anzustellen. Damit fielen patientenabhängige Faktoren wie Alter oder systemische Erkrankungen für die Beurteilung nicht ins Gewicht.

Zur Beurteilung von Unterschieden hinsichtlich des Beobachtungszeitraumes für die Ausbildung eines vollständigen hLEZ-Monolayer wurden die Mittelwerte ermittelt. Mit dem T-Test für unabhängige Stichproben konnte ein Vergleich der einzelnen Konzentrationen hinsichtlich signifikanter Unterschiede durchgeführt werden. Als statistisch signifikant wurden dabei p-Werte $<0,05$ bewertet. Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test wurde die Normalverteilung untersucht. Die Auswertung erfolgte mit der statistischen Software SPSS 14.0 (Spss Inc., Chicago, IL; U.S.A).

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur in-vitro Freisetzung von Mibefradil-beladenen Mikrokapiteln

Basierend auf eigenen Voruntersuchungen (Beck et al. 2000, Beck et al. 2001, Beck et al. 2002, Nebe et al. 2004) sollte eine Wirkstoffkonzentration von 10 μM bis 30 μM Mibefradil innerhalb der ersten 24 Stunden erreicht werden, um verbliebene hLEZ abzutöten und somit ein Auswachsen der Zellen dauerhaft zu verhindern.

Bei der UV-spektroskopischen in-vitro Untersuchung wurden 15,5 mg/l Mibefradil am ersten Tag freigesetzt. Das entspricht bei einer Molmasse des Mibefradils von $M=568,55 \text{ g/mol}$ 27,26 $\mu\text{mol/l}$. Zwischen dem 9. und dem 50. Tag zeigte sich eine lineare Mibefradilfreisetzung von 7,9 mg/l [= 13,89 $\mu\text{mol/l}$] täglich. Nach 50 Tagen wurde die Messreihe abgebrochen, da die Kapseln größtenteils aufgelöst waren. Abbildung 4.1 stellt beispielhaft die kumulative Mibefradilfreisetzung aus den Mikrokapiteln über den auch in der Zellkultur untersuchten Zeitraum von 20 Tagen dar.

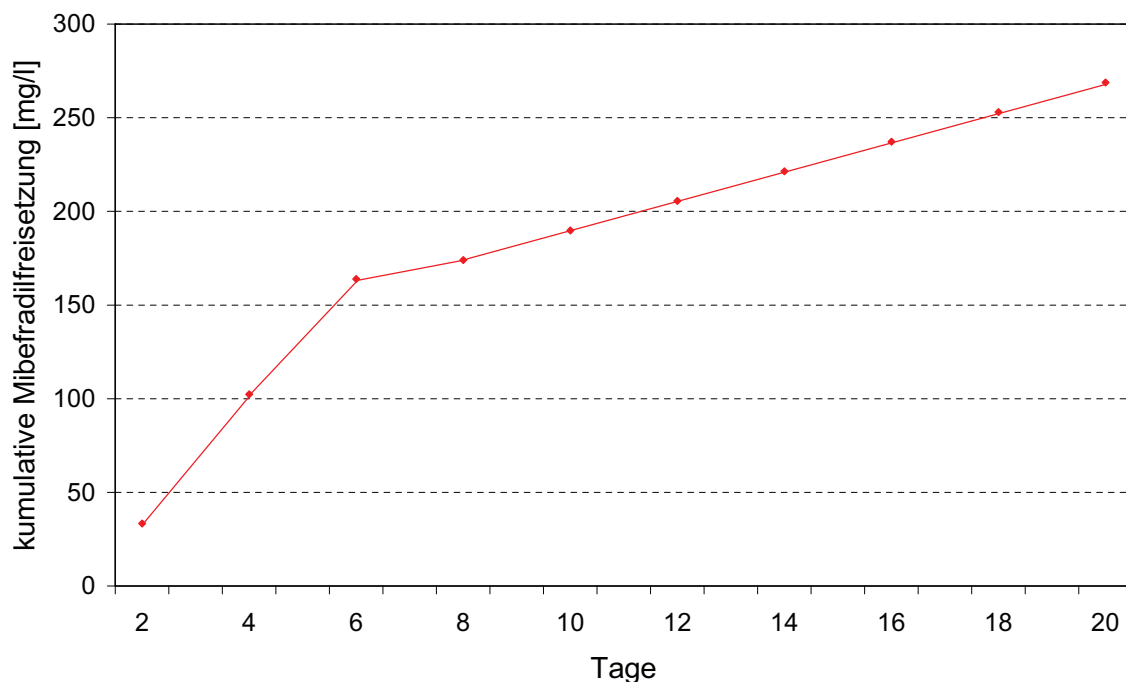


Abb. 4.1: UV-spektroskopische Untersuchung der in-vitro Mibefradilfreisetzung: kumulative Mibefradilfreisetzung über 20 Tage.

Die Masse der in der Zellkultur hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zu untersuchenden und später auf dem Kapselspannring zu installierenden Mikrokapseln, die zum Erreichen der Zielkonzentration von 10 μM , 20 μM bzw. 30 μM Mibefradil notwendig ist, wurde ausgehend vom in-vitro Wirkstofffreisetzungsverhalten der Mikrokapseln kalkuliert. Da die Kultivierung der humanen Kapselsäcke in 1 ml Kulturmedium erfolgte, wurden dem Medium demnach 3,67 mg, 7,34 mg bzw. 11,01 mg Mibefradil-beladene Mikrokapseln zugesetzt, um die entsprechenden Zielkonzentrationen zu erreichen.

4.2 Untersuchungen zum Zellwachstum und zur Morphologie humaner Linsenepithelzellen nach Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten

Das Zellwachstum humaner Linsenepithelzellen im oben beschriebenen humanen Kapselsackmodell wurde nach dem permanenten Einwirken von drei unterschiedlichen Konzentrationen des T-Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil verglichen. Es handelt sich um Paarvergleiche.

4.2.1 Mibefradil-beladene Mikrokapseln in freier Form

In diesem Versuchsansatz wurden zwei Kapselsäcke mit 10 μM Mibefradil, ein Kapselsack mit 20 μM und zwei Kapselsäcke mit 30 μM miteinander verglichen. Insgesamt zeigte sich ausschließlich in der Kontrollgruppe ein kompletter Zellrasen auf der Hinterkapsel innerhalb eines Zeitraums von frühestens nach 10 Tagen und spätestens nach 14 Tagen. Generell konnte beobachtet werden, dass direkt nach der Präparation der humanen Kapselsäcke ein kompletter hLEZ-Monolayer mit typischer einheitlicher, pflastersteinartiger Morphologie auf dem vorderen Kapselblatt bestand. Die Hinterkapsel war frei von Zellen.

Das hLEZ-Wachstum begann im Bereich der Kapsulorhexis und bewegte sich von dort in Richtung Zentrum der Hinterkapsel. Dabei durchliefen die vorderen hLEZ eine Hyperplasie und wandelten sich in spindelförmige Zellen. In der Kontrollgruppe zeigte sich dieses Wachstum bereits in den ersten Tagen. Durchschnittlich konnte ein kompletter hLEZ-Rasen auf der Hinterkapsel an Tag $12 \pm 0,69$ beobachtet werden. Bei den pharmakologisch beeinflussten humanen Kapselsäcken wurde ein Zellwachstum bereits in einer Konzentration von 10 μM bis zum Endpunkt der

Versuchsreihe - kompletter Zellrasen auf der Hinterkapsel der Kontrollgruppe - wirksam verhindert.

Wurden Mibefradil-beladene Mikrokapseln in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt, zeigten sich bereits nach 24 Stunden gestörte Zell-Zellkontakte - jedoch ohne sichtbare Beeinträchtigung der Zelladhäsion. Der Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten in einer Konzentration von 20 μM führte zur Lösung von Zell-Zellkontakten. Eine 24-stündige Inkubation mit 20 μM Mibefradil führte zu einer typischen heterogenen Zellform mit polygonaler Morphologie. Die Zellfläche war reduziert. Eine Konzentration von 30 μM Mibefradil beeinträchtigte signifikant die Zelladhäsion. Die Zellen zeigten eine drastisch reduzierte Zellfläche der einzelnen Zelle. Die Zellen rundeten sich ab und lösten sich schließlich vom Substrat.

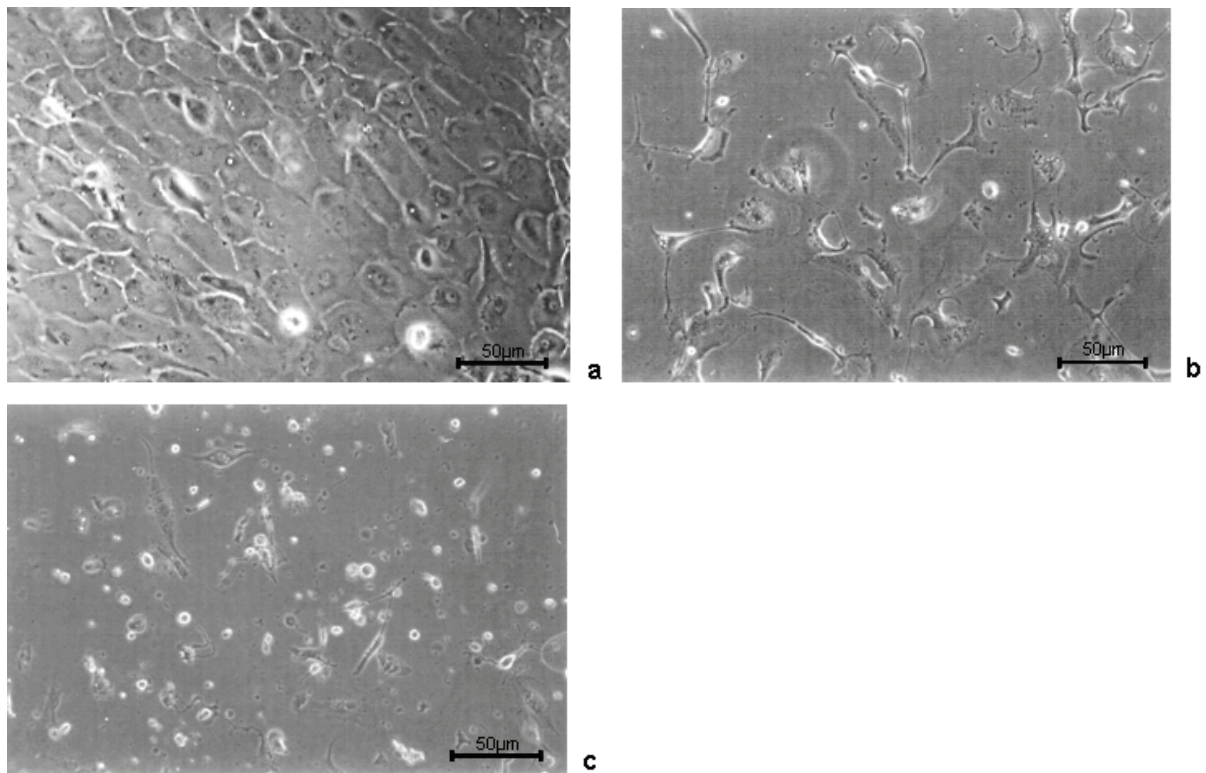


Abb. 4.2: a: Mikroskopisches Bild vom hLEZ-Monolayer (Kontrolle) auf der Hinterkapsel. Typische homogene Morphologie im Proliferationsbereich, 20-fache Vergrößerung.

b: Mikroskopischer Aspekt hLEZ auf dem vorderen Kapselblatt nach Inkubation mit 10 μM Mibefradil am 12. Tag. Typische heterogene Zellform mit polygonaler Morphologie, Reduktion der Zellfläche, 20-fache Vergrößerung.

c: Mikroskopischer Aspekt hLEZ auf dem vorderen Kapselblatt nach Inkubation mit 20 μM Mibefradil am 12. Tag. Typische heterogene Zellform sowie abgekugelte Zellform abgelöster Zellen durch gelöste Zell-Zellkontakte, weitere Reduktion der Zellfläche, 20-fache Vergrößerung.

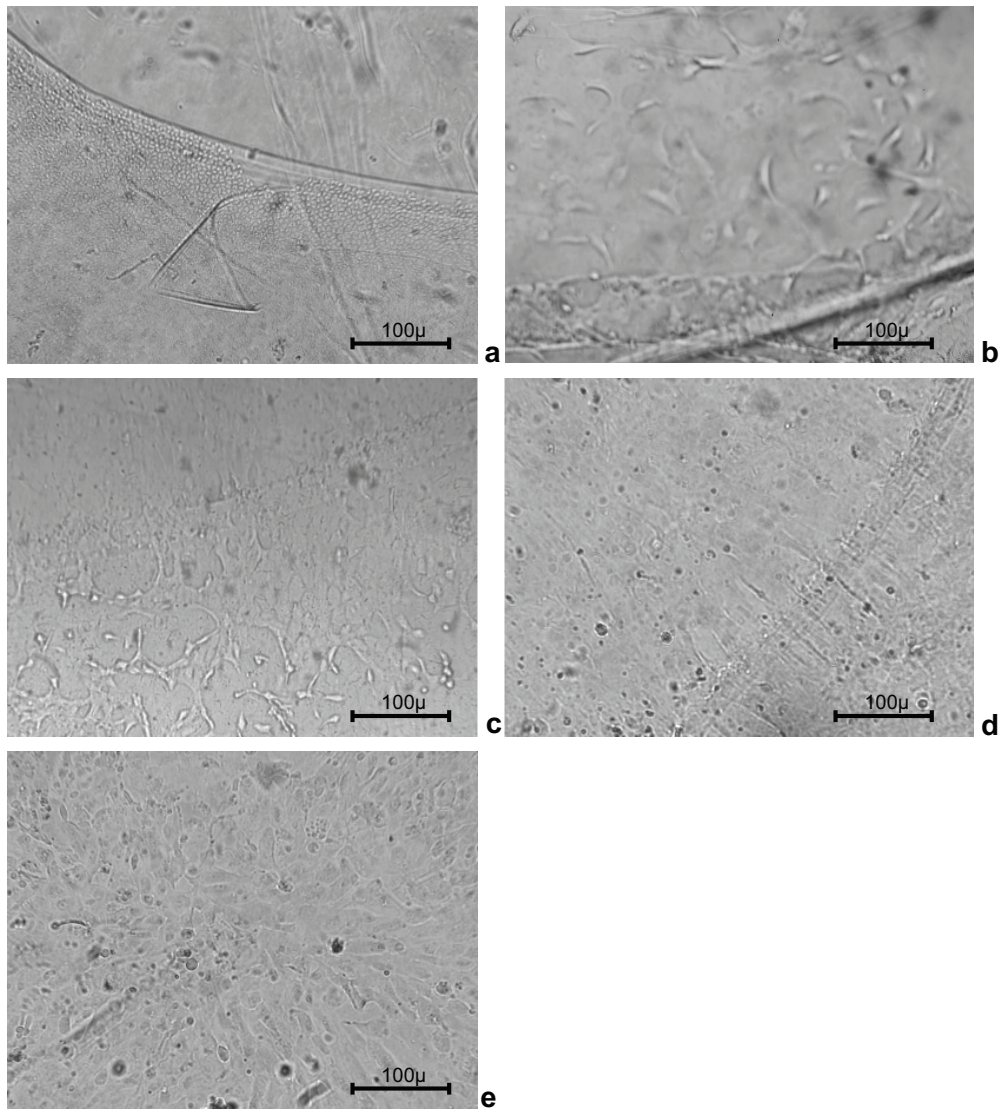


Abb 4.3: a: Mikroskopischer Aspekt hLEZ-Monolayer auf dem vorderen Kapselblatt am Tag der Präparation. Einheitliche, pflastersteinartige Morphologie der Zellen im Bereich der Rhexis, hinteres Kapselblatt frei von Zellen, 4-fache Vergrößerung.

b: Mikroskopischer Aspekt hLEZ-Monolayer am 3. Tag der Beobachtung. Einheitliche, pflastersteinartige Morphologie der Zellen im Bereich der Vorderkapsel, im Rhexisbereich beginnende Proliferation von hLEZ auf das hintere Kapselblatt, 4-fache Vergrößerung.

c: Mikroskopischer Aspekt hLEZ-Monolayer am 6. Tag der Beobachtung. Typische heterogene Zellform auswachsender Zellen mit polygonaler, fusiformer Morphologie, 4-fache Vergrößerung.

d: Mikroskopischer Aspekt hLEZ-Monolayer am 9. Tag der Beobachtung. Konfluenten Monolayer-Aspekt im Rhexisbereich, auswachsende Zellen erreichen das Zentrum des hinteren Kapselblattes, 4-fache Vergrößerung.

e: Mikroskopischer Aspekt hLEZ-Monolayer am 12. Tag der Beobachtung. Konfluenten Monolayer bis in das Zentrum des hinteren Kapselblattes mit einheitlicher, pflastersteinartiger Morphologie der Zellen. Zentripetales Wachstum der hLEZ deutlich erkennbar, 4-fache Vergrößerung.

Lichtmikroskopisch beginnen die verbliebenen hLEZ innerhalb weniger Tage nach Explantation des humanen Kapselsackes aus den Spenderbulbi und entsprechender Kultivierung zu proliferieren. Die auswachsenden hLEZ bilden mit fortschreitender Kultivierungsdauer, im Mittel am 12. Tag, einen geschlossenen Monolayer. Die rhexisrandnah gelegenen Zellen zeigen annähernd die gleiche Morphologie wie die auf dem vorderen Kapselblatt verbliebenen ursprünglich vorhandenen hLEZ. Die Zellen liegen dicht gepackt nebeneinander und bilden eine wabenartige bzw. pflastersteinartige Struktur mit relativ einheitlicher Zellgröße. Die auf dem hinteren Kapselblatt zum Zentrum hin auswachsenden Zellen zeigen dagegen eine unregelmäßige Form und sehen eher langgestreckt und im Vergleich vergrößert aus. Der Kontakt der hLEZ mit dem zugeführten T-Kalziumkanal-Antagonisten führt unmittelbar nach Zugabe zu einer beginnenden Zellretraktion, die sich nach 24 Stunden bereits bei einer Konzentration von 10 μ M Mibefradil in einer Abnahme der Anzahl adhärenter Zellen und dem Verlust von Zell-Zellkontakten bei den noch auf dem Substrat haftenden Zellen manifestiert.

4.2.2 Mibefradil-beladene Mikrokapseln gekoppelt an die Kapselspannringoberfläche

Die Ergebnisse, die mit einer Konzentration von 10 μ M Mibefradil in freier Form gezeigt werden konnten, fanden wir auch für die beiden modifizierten Kapselspannringe.

Über den gesamten Beobachtungszeitraum konnten keine auswachsenden Zellen nachgewiesen werden. Es zeigte sich über die Zeit im Bereich der hLEZ auf dem vorderen Kapselblatt ein negativer Einfluss auf die Zell-Zellkontakte. Der unmittelbar nach der Präparation der humanen Kapselsäcke bestandene geschlossene Zellverband war bedingt durch einen zunehmenden Schwund adhärenter Zellen vereinzelt aufgebrochen.

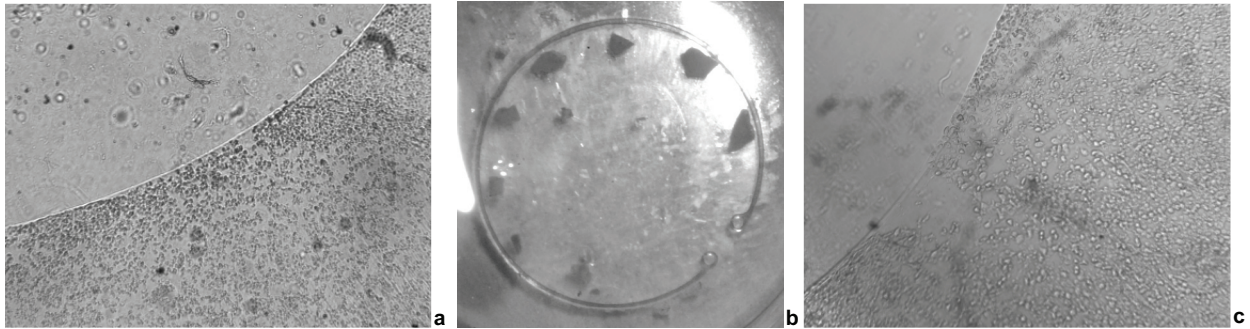


Abb 4.4: a: Mikroskopischer Aspekt hLEZ auf dem vorderen Kapselblatt nach Inkubation mit 2.8 mg Mibefradil beladenem Kapselspannring am 12. Tag. Reduktion der Zellfläche auf dem vorderen Kapselblatt, keine hLEZ auf der Hinterkapsel, 4-fache Vergrößerung.
 b: Makroskopische Aufnahme vom humanen Kapselsackmodell mit implantiertem, modifiziertem Kapselspannring in der Zellkultur.
 c: Mikroskopischer Aspekt hLEZ auf dem vorderen Kapselblatt nach Inkubation mit 4.5 mg Mibefradil beladenem Kapselspannring am 12. Tag. Reduktion der Zellfläche auf dem vorderen Kapselblatt, keine hLEZ auf der Hinterkapsel, 4-fache Vergrößerung.

4.3 Untersuchungen zur metabolischen Aktivität humaner Linsenepithelzellen nach Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten

Die Inkubation von hLEZ mit dem T-Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil in einer Konzentration von 30 μM für 24 Stunden resultierte in einer Hemmung der Zellproliferation. Bei dieser Konzentration betrug die metabolische Aktivität der hLEZ nach 24 Stunden nur noch 47,59%. Die metabolische Aktivität nahm also innerhalb von 24 Stunden um 52,4% ab. In der Abbildung 4.6 ist die metabolische Aktivität bei unterschiedlicher Mibefradil-Konzentration dargestellt. Die metabolische Aktivität betrug bei einer Wirkstoffkonzentration von 10 μM nach 24 Stunden noch 83,83% und 65,13% bei einer Konzentration von 20 μM Mibefradil. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Mibefradil-Konzentrationen waren statistisch signifikant. Zwischen der Kontrollgruppe und der Mibefradilgruppe bestand bei einer Konzentration von 10 μM ein schwach signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), bei einer Konzentration von 20 μM und 30 μM bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$).

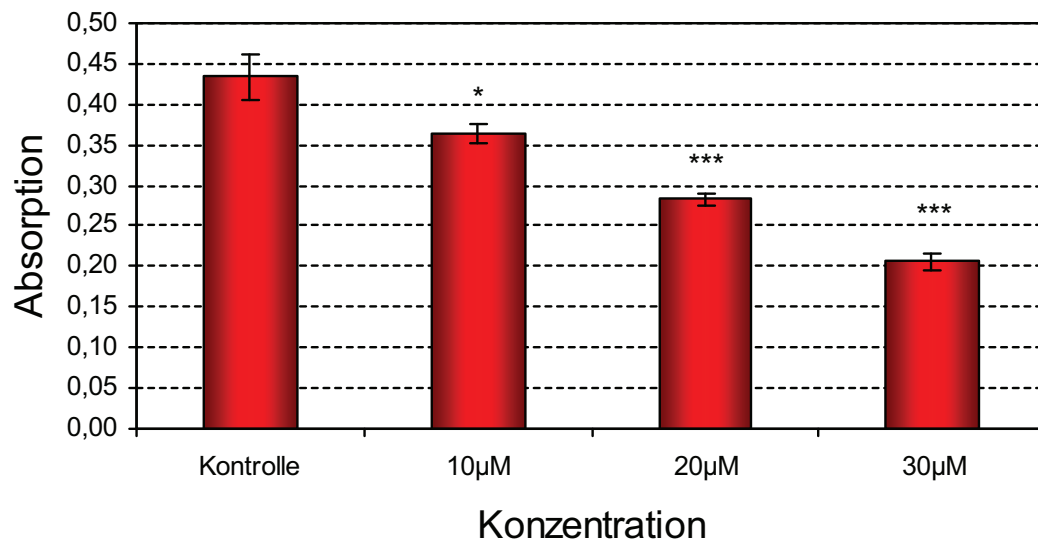


Abb. 4.5: MTT-Test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität hLEZ nach permanenter Einwirkung von Mibefradil a) 10 µM, b) 20 µM, c) 30 µM über 24 Stunden: spektrofotometrische Absorption hLEZ. Als Parameter für die Streuung werden die oberen und unteren Quartile angezeigt (* $p < 0.05$., *** $p < 0.001$).

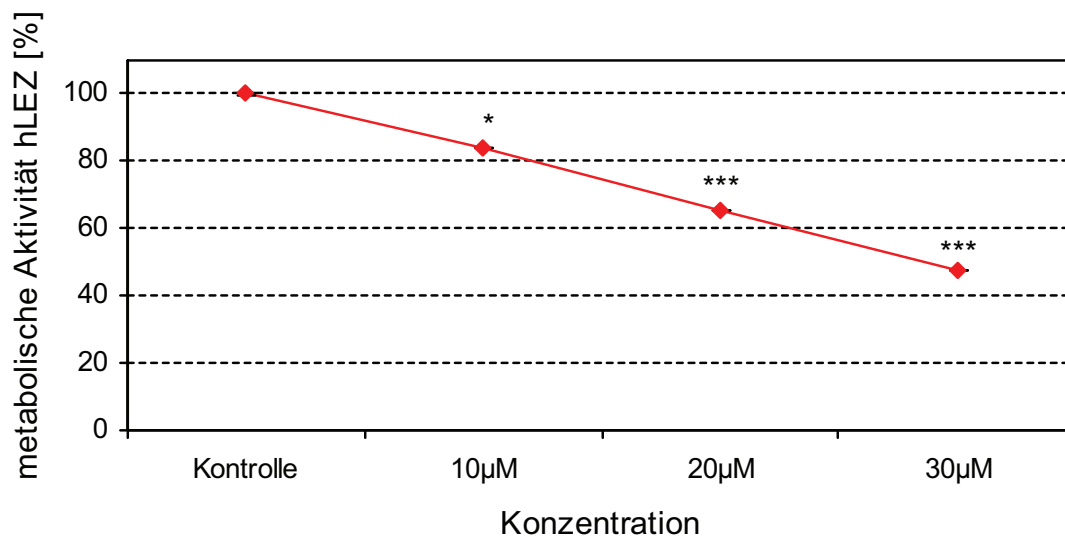


Abb. 4.6: MTT-Test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität hLEZ nach permanenter Einwirkung von Mibefradil a) 10 µM, b) 20 µM, c) 30 µM über 24 Stunden: grafische Darstellung der metabolischen Aktivität pharmakologisch beeinflusster hLEZ bezogen auf die Monolayer-Kultur. Der Unterschied zwischen den pharmakologisch beeinflussten hLEZ und den unbeeinflussten hLEZ ist statistisch signifikant (* $p < 0.05$., *** $p < 0.001$).

4.4 Untersuchungen zur Vitalität humaner Linsenepithelzellen nach Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten

Lebende Zellen sind durch eine intakte Zellmembran charakterisiert. Calcein AM wird in das Zytoplasma vitaler Linsenepithelzellen aufgenommen und bis in die Zellfortsätze verteilt. Ethidium Homodimer gelangt nur durch die defekte Zellmembran geschädigter Linsenepithelzellen in die Zelle und bindet dort an die Nukleinsäure des Kerns.

Nach durchschnittlich 12-tägiger Inkubation der humanen LEZ mit 10 μM Mibefradil zeigte sich die Mehrheit der Linsenepithelzellen in Zellkultur vital. Die rote Kernfluoreszenz toter Zellen zeigte sich nur vereinzelt. Unter Einfluss von 20 μM Mibefradil war rund die Hälfte der Linsenepithelzellen geschädigt bzw. tot. Vitale Zellen wiesen zudem eine deutlich veränderte Zellstruktur auf. Durch den Einfluss von 30 μM Mibefradil wurde die Plasmamembran der hLEZ massiv geschädigt und somit nur die rote Kernfluoreszenz der Zellen darstellbar.

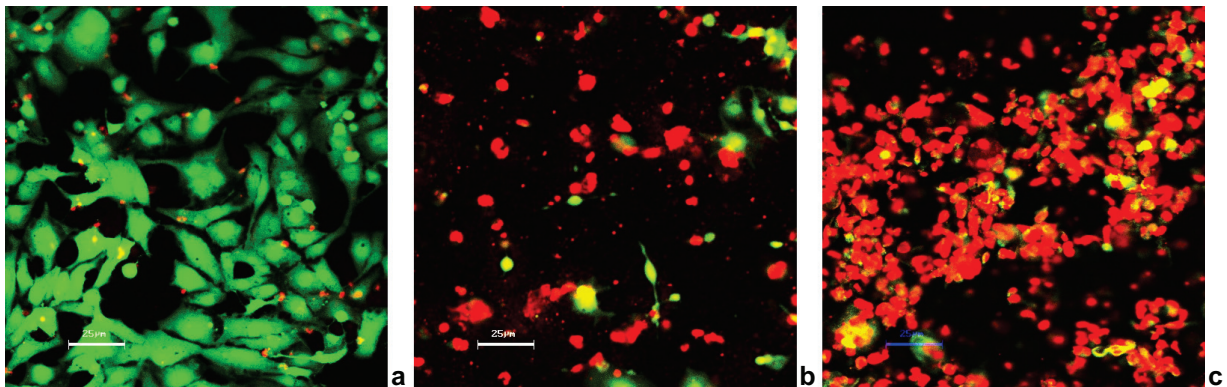


Abb. 4.7: Viabilitätstest mittels Live/Dead-Kit am Endpunkt der Versuchsreihe ($12 \pm 0,69$ Tage). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme hLEZ nach Einfluss der Mibefradil-beladenen Mikrokapseln in einer Konzentration von a) 10 μM , b) 20 μM und c) 30 μM . Vitale Zellen zeigen eine grüne Zytoplasmafluoreszenz, abgestorbener Zellen zeigen die charakteristische rote Kernfluoreszenz, 200-fache Vergrößerung (LSM 410, Carl Zeiss).

4.5 Untersuchungen zum Aktinzytoskelett humaner Linsenepithelzellen nach Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten

Die Integrin-vermittelte Zelladhäsion wird durch ihre Interaktion mit dem Aktinzytoskelett reguliert.

Humane Linsenepithelzellen weisen ein ausgeprägtes, randständiges Aktinzytoskelett mit die Zelle durchziehenden Stressfasern auf, was als charakteristisch für Epithelzellen anzusehen ist. Die unbeeinflussten hLEZ der humanen Kapselsäcke zeigten diese strahlenförmige Anordnung sowie eine membranständige Lokalisation. Durch den Einfluss von 10 μM Mibefradil wurde das Aktinzytoskelett fragil. Das Aktinzytoskelett behält jedoch seine ursprüngliche Organisation überwiegend bei und folgt den Zellformänderungen. Eine Konzentration von 20 μM Mibefradil dagegen bewirkt einen fast vollständigen Abbau des Aktinzytoskeletts. Die Aktinfilamente ließen sich nur als desorganisierte Fragmente nachweisen (Abb. 4.8).

Die Untersuchungen zeigten, dass der T-Kalziumkanal-Antagonist Mibefradil durch die Fragmentierung des Aktinzytoskeletts eine wichtige zelluläre Komponente der Zelladhäsion stark beeinflusst.

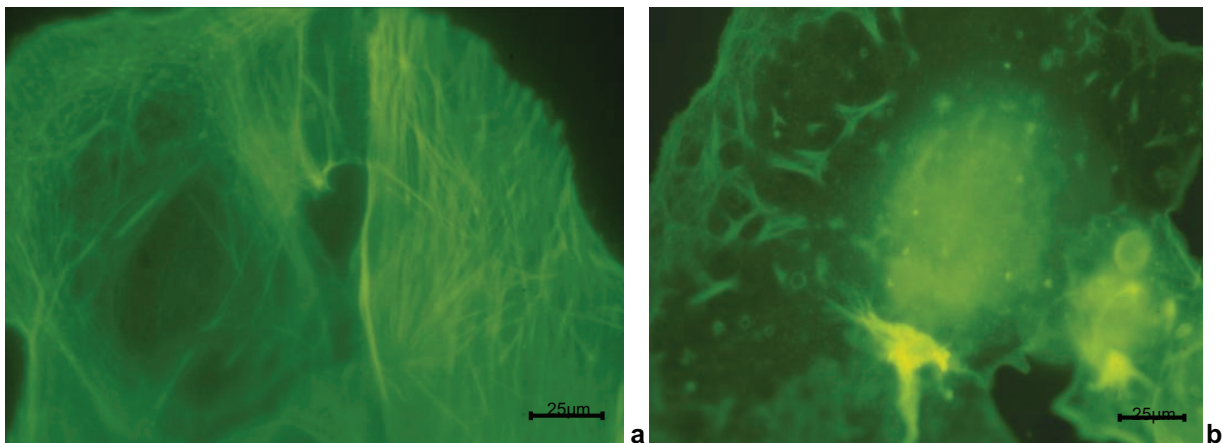


Abb. 4.8: Fluoreszenzmikroskopischer Aspekt unbeeinflusster hLEZ am Endpunkt der Beobachtung: ausgeprägtes, randständiges Aktinzytoskelett mit z.T. kräftigen, die Zelle durchziehenden Stressfasern (a), Fragmentierung des Aktinzytoskeletts nach Inkubation mit 20 μM Mibefradil (b), 200-fache Vergrößerung (LSM 410, Carl Zeiss).

5. Diskussion

5.1 Methodenkritische Bemerkungen

Das Problem der Nachstarentwicklung ist nach wie vor nicht gelöst, wobei die Entwicklung des Nachstars die wesentliche Komplikation nach Katarakt-Operation darstellt. Die Behandlung eines Nachstars kann entweder chirurgisch erfolgen oder mittels Nd:YAG-Laser-Kapsulotomie.

1998 lag die Nd:YAG-Laser-Rate in den USA bei 573.000 von insgesamt 1,6 Millionen durchgeführten Katarakt-Operationen (The Health Care Financing Administration 2000). Laut dem amerikanischen Gesundheitsministerium entstehen jährlich in Verbindung mit Katarakt-Operationen durch die Nd:YAG-Kapsulotomie die größten Kosten neben den eigentlichen Operationskosten. Trotz stetiger Reduktion der Nachstarrate in den vergangenen Jahren ist es bislang nicht gelungen, den Nachstar vollständig zu vermeiden. Die weltweit zunehmende Zahl an Katarakt-Operationen bedarf deshalb einer weiteren Erforschung der Faktoren, die zum Nachstar führen, sowie solcher, die den Nachstar verhindern.

Dabei kommt dem IOL-Design gegenwärtig die wesentlichste Rolle in der Nachstarprävention (Buehl et al. 2002b, Hollick et al. 1999b, Nishi et al. 1998a) zu. Optimale Modelle zur Testung neuer Ansätze, die die Verhältnisse in-vivo möglichst getreu simulieren, ohne von klinischen Beobachtungen abhängig zu sein, sind nach wie vor nicht vorhanden. Es ist daher sinnvoll, ein zuverlässiges Modell für die Untersuchung der Nachstar-inhibitorischen Potenz sowohl von IOL als auch für Pharmakologika bzw. physikalischer Anwendungen zu etablieren, das vergleichende Ergebnisse in relativ kurzer Zeit zulässt.

Soll die Abhängigkeit der Nachstarentwicklung von unterschiedlichen pharmakologischen Substanzen untersucht werden, kommen neben klinischen Untersuchungen ausschließlich in-vitro Versuche in Frage.

Lediglich die unter 1.6.4.2 aufgeführten Modelle von Saxby et al. (1998), El-Osta et al. (2003) und Liu et al. (1996) nutzen humane Kapselsäcke ex-vivo zur Untersuchung von Linsenepithelzellen und Erprobung von IOL.

Saxby und Mitarbeiter (1998) implantierten einen ca. 2 mm (1,78 mm) breiten Silikonring in den Kapselsack vor der Kultivierung. Diese Situation entspricht jedoch nicht dem klinischen Alltag (Menapace et al. 1999, Menapace et al. 2007, Nishi et al.

1998b, Nishi et al. 1998c), da Kapselspannrings nur in speziellen Situationen, wie z.B. bei partieller Zonulolyse, eingesetzt werden. Zudem ist anzunehmen, dass der Kapselspannring im Äquatorbereich der Linsenkapsel das Wachstum der Linsenepithelzellen hemmt oder deutlich verzögert (Nishi et al. 1998c). Das Modell von Saxby et al. (1998) zeigt im Vergleich zu denen von El-Osta et al. (2003) und Liu et al. (1996) beim LEZ-Wachstum eine deutliche zeitliche Verzögerung. Über 4 Einkerbungen, wodurch der direkte Kontakt zur Linsenkapsel und damit eine Barrierefunktion an diesen Stellen verhindert werden soll, wurde versucht, diesen Effekt zu minimieren. Neben dem LEZ-Wachstum können Prozesse der Linsenkapsel wie Schrumpfung und Fältelung beobachtet werden.

Man geht heute davon aus, dass sich der Nachstar zum Teil aus den verbliebenen Linsenepithelzellen der Vorderkapsel entwickelt. An post mortem untersuchten Kapselsäcken mit implantierter IOL wurden mitunter Verklebungen zwischen Vorder- und Hinterkapselblatt beschrieben (Findl et al. 1998, Marcantonio et al. 2000). Der Nachstar entsteht aber auch durch Wanderung der Linsenepithelzellen aus der Äquatorregion auf die Hinterkapsel, deshalb besteht der Versuch der Nachstarprophylaxe, wie unter 1.5 ausgeführt, unter anderem in der Anwendung von pharmakologischen Substanzen.

Eine permanente Inkubation mit dem T-Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil entspricht nicht den Bedingungen in-vivo. Infolge des Kammerwasser-Turnovers ist mit einem raschen Ausspülen des Pharmakons zu rechnen. Angesichts der Vorstellung, dass ein kurzzeitiges Einwirken keinen ausreichenden Effekt auf die Adhäsion und Proliferation der hLEZ haben würde, wurden bereits Versuche zur verzögerten intraokularen Freisetzung von Mibefradil unternommen. Dazu wurde Intraokularlinsenmaterial (PMMA) mit dem Wirkstoff Mibefradil beladen. Geprüft wurden 2 Verfahren der Wirkstoffbeladung: zum einen die ionische und kovalente Ankopplung von Mibefradil an die Polymeroberfläche und zum anderen die Inkorporation von Mibefradil in die Polymermatrix. Die Ankopplung von Mibefradil an die Oberfläche von PMMA erforderte im Vorfeld eine nasschemische Aktivierung der PMMA-Oberfläche. Der Aktivierung waren jedoch Grenzen gesetzt, da mit zunehmender Behandlung eine Trübung der PMMA-Folien und eine oberflächliche Zerstörung (Risse und Sprünge) von PMMA-Linsen zu beobachten war. Die bei der Oberflächenbindung an PMMA-Linsen erreichten Konzentrationen von Mibefradil reichten bedingt durch eine unzureichende Aktivierung der Oberfläche nicht aus.

Deshalb wurde die Inkorporation von Mibefradil in die Polymermatrix PMMA untersucht. Es zeigte sich, dass das Verfahren der Wirkstoffeinbettung eine kontinuierliche Freisetzung von Mibefradil unter Erhalt der Stabilität der Polymermatrix ermöglicht. Durch die Höhe der Wirkstoffbeladung ist die Freisetzungskinetik des inkorporierten Wirkstoffs steuerbar. Da bei der Einbettung von Mibefradil in die Polymermatrix eine nicht vermeidbare Trübung des Materials auftritt, die eine Eignung des Verfahrens für wirkstoffbeladene IOL ausschließt, untersuchten wir in der hier vorliegenden Arbeit die Verwendbarkeit des Verfahrens an Kapselspannrings. Das Ziel der experimentellen Arbeit war es, das Linsenepithelwachstum nach „Open-sky“-Katarakt-Operation und Implantation eines Kapselspannrings in ein humanes Kapselsackmodell ex-vivo mittels des T-Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil zu hemmen.

Die Synthese eines wirkstoffbeladenen Polymers und dessen chemische Ankopplung an die Kapselspannringoberfläche konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die wirkstoffbeladenen Mikrokapseln waren 20 – 30 µm groß und wiesen eine sphärische Gestalt auf. Die Beladung des Polymers mit Mibefradil als Wirkstoff lag im Durchschnitt bei 38 mg/g. Die Freisetzung des Wirkstoffes in Lösung innerhalb der ersten 24 Stunden betrug 15,5 mg/l [27,26 µmol/l]. Ein Langzeittest über 50 Tage erbrachte einen theoretischen Tageswert von 7,9 mg/l [13,89 µmol/l]. Nach Tag 50 wurde der Test abgebrochen, da die Kapseln größtenteils aufgelöst waren. Der Kapselspannring wurde für die hier vorliegende Arbeit mit 2,8 mg bzw. 4,5 mg Mibefradil beladen - was einem Wirkstoffgehalt in Lösung von 7,6 µmol/l bzw. 12,2 µmol/l Mibefradil entspricht.

In der Anwendung der Mikrokapseln – sowohl in freier als auch in gebundener Form an die Kapselspannringoberfläche – zeigte sich zum einen, dass innerhalb der ersten 24 Stunden nur in ihrer direkten Umgebung ein zellschädigender Effekt auftrat, zum anderen war während der Implantation in den Kapselsack erhebliche Vorsicht geboten, damit die Mikrokapseln nicht abfielen. Aufgrund der Größe der Mikrokapseln wurde der Kapselspannring sehr unhandlich und teilweise sperrig in seiner Handhabung.

Die Freisetzung von Mibefradil aus dem Polymer konnte eine sichtbare Änderung des Zellwachstums hervorrufen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass unter dem Einfluss von Mibefradil die metabolische Aktivität der hLEZ signifikant abnimmt und sich die Linsenepithelzellen vom Substrat lösen und absterben. Zudem konnten

Veränderungen im Zytoskelett der hLEZ nachgewiesen werden. In der Durchführung der einzelnen Zelltests zeigte sich die eingeschränkte Anwendbarkeit des ex-vivo-Kapselsackmodells. Ihre Durchführung war aufgrund von unerwarteten Interaktionen im Kapselsackmodell nicht möglich. Daneben muss berücksichtigt werden, dass es sich bei dem Kapselsackmodell um ex-vivo Material handelt – eine unbegrenzte Verfügbarkeit ist somit nicht gegeben.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass es grundsätzlich möglich ist, Wirkstoff aus pharmakologisch modifizierten Kapselspannringen freizusetzen und damit eine gezielte medikamentöse Prophylaxe des Nachstars zu ermöglichen. Die erwähnten Probleme, welche durch das Syntheseverfahren hervorgerufen wurden, sollten für eine mögliche Anwendung im Tiermodell behoben werden können. Obwohl die Mikropartikel im Vergleich zur Beschichtung den Vorteil aufweisen, dass die Mikrokapseln eine genaue Kalkulation der Wirkstoffbeladung zum Erreichen der Zielkonzentration erlauben, sollte eine gleichmäßige dünne Beschichtung hierbei von Vorteil sein und die Handhabung verbessern.

5.2 Einschätzung der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur

Aus der bisherigen Forschung zum Nachstar lässt sich folgern, dass nur ein gezieltes Eingreifen in die Zellbiologie das Problem der Cataracta secundaria entscheidend lösen kann. Zellbiologisch gibt es, wie unter 1.5.3 aufgeführt, die bekannten Ansätze wie Toxine bzw. gekoppelt an Antikörper als Immunotoxine, Hemmung der Adhäsion, Entzündungshemmer und gentherapeutische Strategien. Das wesentliche Handicap bei den bisher verfolgten zellbiologischen Strategien zur Nachstarprävention besteht in der Gewebeunspezifität, d. h., es werden umliegende Gewebe, wie z.B. die Keratozyten der Kornea, mit beeinträchtigt. Voraussetzung für entscheidende Fortschritte im Rahmen der zellbiologischen Ansätze ist ein besseres Verständnis der zellbiologischen Mechanismen bei der Entstehung der Cataracta secundaria. Ziel in der Anwendung pharmakologischer Substanzen ist es, durch gezielte örtliche Applikation ausschließlich die LEZ nach Kataraktoperation zu blockieren und kein umliegendes Gewebe toxisch zu beeinträchtigen. Das von uns verfolgte Ziel – die Blockierung des intrazellulären Kalziums durch Kalziumkanalblocker, um vor allem die Integrin vermittelte Signaltransduktion und in der Konsequenz adhäsionsabhängige Funktionen der Zelle zu blockieren – wird durch Erkenntnisse aus der

Literatur gestützt, dass proliferierende Zellen eine größere Anzahl von T-Kalziumkanälen als nicht proliferierende Zellen besitzen (Wang et al. 2002, Schmitt et al. 1995). Gegenwärtig gibt es für die klinische Anwendung verschiedene Wege, die in Betracht gezogen werden, wie die direkte Applikation in den Kapselsack während der Kataraktoperation und/oder die Ankopplung an die Kunstlinse, um eine lokal und zeitlich kontrollierte Freisetzung eines Pharmakons zu erreichen. Verschiedene Autoren entwickelten Wirkstofffreisetzungssysteme, die die Substanzen im Kapselsack kontinuierlich abgeben sollten (Nishi 1999a, Nishi et al. 1996, Sun et al. 2003, Tetz et al. 1999, Tetz et al. 1996d, Wesendahl et al. 1996). Tetz et al. (1996d) benutzten ein IOL-gebundenes System, während Wesendahl et al. (1996) speziell expansible Hydrogel-IOL verwendeten, die selbst in ihrem Polymernetzwerk mit verschiedenen Substanzen beladen wurden. Duncan et al. (1997) zeigten am Kapselsackmodell, dass direkt an die PMMA-Linse aufgebracht Thapsigargin effektiv die Zellpopulation abtötete. Maloff et al. (2003) entwickelten eine Möglichkeit, mit einem Vakuumdeckel den Kapselsack zu isolieren und selektiv mit verschiedenen Substanzen zu spülen.

Zur Nachstarprävention wurden verschiedene IOL-Typen entwickelt, die sich in Material, Design, Dimension und Haptikkonstellation unterscheiden. Die Nd:YAG-Laser-Kapsulotomie-Rate liegt für Polymethylmethacrylat(PMMA)-IOL (mit oder ohne Heparinbeschichtung) zwischen 50% und 55% (Kahn et al. 1999, Winther-Nielsen et al. 1998), für Silikon-IOL zwischen 24% und 40,6% (Olson et al. 1998, Milazzo et al. 1998), für eine Linse aus einem Copolymer von Methylmethacrylat, 2-Hydroxyethylmethacrylat und 4-Methacryloxy-2-Hydroxybenzophenon bei 22,2% (Pötzsch et al. 1996) und zwischen 0% und 8,7% für weiche hydrophobe Acrylat-Linsen (Hollick et al. 1999b, Akahoshi 1999, Oner et al. 2000, Apple et al. 2001, Schmidbauer et al. 2001, Davison 2002). Eine scharfkantige Hinteroptik stellt - ebenso wie ein kapselgerechtes Linsendesign - eine wirksame Migrationsbarriere dar, wobei eine zusätzliche schlanke Haptikanbindung die Kapselkantung am wenigsten beeinträchtigt. Übergroße und starre Haptiken schwächen die Barrierebildung entlang der Linsenachse. Fibrose induzierende Materialeigenschaften sind zudem maßgeblich für eine nachhaltige Nachstarblockade entlang des Optikrandes. Zudem verhindert eine gründliche Reinigung des Kapselsackes die Bildung eines Soemmering-Rings („cortex fiber peeling“). Außerdem ist eine zirkuläre Überlappung der Optik durch die Vorderkapsel die

Voraussetzung für eine dauerhafte Barrierewirkung. Die Nd:YAG-Laser-Kapsulotomie ist in der Regel einfach und ambulant durchführbar. Jedoch ist die Laserbehandlung nicht frei von Komplikationen. So kann es zur Beschädigung der IOL-Beschichtung (12%), vorübergehende intraokulare Drucksteigerung (8,5%), einem zystoiden Makulaödem (0,68%), einer Netzhautablösung (0,17%), einem Hyphäma (0,15%), einer Iritis (0,1%) und IOL-Dezentrierung (0,1%) kommen (Shah et al. 1986).

Die chirurgische hintere Kapsulotomie ist neben dem Operationsrisiko auch mit zusätzlichen Kosten verbunden. Obwohl die Methode mit der Zeit optimiert worden ist, besteht nach wie vor wie bei jedem intraokularen Eingriff einerseits das Risiko von Infektionen und Blutungen und andererseits die Gefahr einer postoperativen Netzhautablösung, einer irreversiblen Hornhautdekomensation, einer revisionsbedürftigen Aderhautamotio, einer intraoperativen Hinterkapselruptur und einer IOL-Dislokation.

5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Durch die Implantation des pharmakologisch modifizierten Kapselspannrings werden verbliebene Linsenepithelzellen im Äquatorbereich und auf dem vorderen Kapselblatt geschädigt. Dadurch wird die Proliferation bzw. die Metaplasie der Linsenepithelzellen wirksam gehemmt. Solche Epithelreste führen postoperativ durch ihr Wachstum zur Cataracta secundaria und damit zur erneuten Sehverschlechterung. Jeder dadurch notwendig werdende Eingriff bedeutet neben der Belastung für den Patienten auch die Gefahr von Komplikationen und das Auftreten zusätzlicher Kosten. Die Möglichkeit, zukünftig im Rahmen der Kataraktchirurgie einen pharmakologisch modifizierten Kapselspannring zu implantieren, der kontinuierlich den Wirkstoff freigibt sowie potenziell toxisch nur auf proliferierende Zellen wirkt, stellt somit eine Chance für die Nachstarprophylaxe dar.

Die Ergebnisse deuten an, dass die Anwendung pharmakologisch modifizierter Kapselspannrings eine Verbesserung der Operationsergebnisse bzw. eine erniedrigte Nachstar-Inzidenz erbringen könnte, und ermutigt zu weiteren Untersuchungen, um dieses Verfahren am menschlichen Auge einsetzen zu können. Die hier vorliegende experimentelle Arbeit ist Teil der Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Cataracta secundaria. Durch standardisierte Versuchsbedingungen

konnte eine hohe interne Validität (= Eindeutigkeit) erreicht werden. Problematisch ist dagegen die externe Validität: Laborbedingungen können nicht auf den klinischen Alltag, Vorgänge im statischen System nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragen werden (= Generalisierbarkeit). Um die Anwendung der pharmakologischen Polymere und die Anpassung der Versuchsbedingungen an physiologische und biochemische Abläufe in-vivo, wie vor allem das Kammerwasser-Turnover, zu optimieren, sind weitere Versuche notwendig. Labor- und Tierversuche schaffen hierbei die Voraussetzung für eine klinische Prüfung. Dabei gilt zurzeit: keine Tierversuche ohne nachfolgende klinische Studien an Menschen. Tiere weisen jedoch anatomisch und physiologisch sowie in ihren biochemischen Abläufen andere Verhältnisse auf als der Mensch. Damit stellen Tierversuchsergebnisse ein unberechenbares Risiko dar – was unzählige Arzneimittelkatastrophen (Tanderil, Amuno, Contergan) in der Vergangenheit und in der Gegenwart beweisen. Vor allem auf dem Gebiet der Grundlagenforschung werden Tierexperimente in hoher Zahl durchgeführt. Durch die Erkenntnis einer völlig unbefriedigenden Verwertbarkeit der Tierversuchsergebnisse und deren Risiken für den Menschen wendet man sich in zunehmendem Maße neuen Methoden an schmerzfreier Materie zu. Zudem können zahlreiche tierversuchsfreie Methoden Tierexperimente überflüssig machen. Zu den wichtigsten in-vitro-Systemen zählen Zell- und Gewebekulturen. Menschliche und tierische Organe oder Organteile, die nach Operationen anfallen bzw. post mortem der Wissenschaft zu Verfügung gestellt werden, erlauben einerseits toxikologische Untersuchungen und können andererseits der Grundlagenforschung dienen. Dabei kommt dem Organkultur-Modell, wie in der vorliegenden Arbeit vorgestellt, eine besondere Bedeutung zu. Es ermöglicht im Vergleich zur Zellkultur, klinisch orientiert in-vivo-Vorgänge zu simulieren.

Weitere Experimente müssen die ersten vielversprechenden Ergebnisse verifizieren. Vorrangig hierbei sollte die Optimierung des Syntheseverfahrens der pharmakologisch modifizierten Mikropartikel sowie eine gleichmäßige Beschichtung der Kapselspannringe sein. Des Weiteren müssen nachfolgende Studien einen toxischen Effekt auf das umliegende Gewebe ausschließen.

6. Zusammenfassung

In der modernen Kataraktchirurgie ist der Nachstar nach wie vor die häufigste Komplikation in den ersten fünf Jahren postoperativ. Eine wirksame Vermeidung des Nachstars nach Phakoemulsifikation mit Kunstlinsenimplantation ist derzeit nicht möglich.

Durch das Operationstrauma kommt es zu einer verstärkten Proliferationsaktivität und einer damit verbundenen erhöhten Regenerationsfähigkeit der verbliebenen Linsenepithelzellen im Kapselsack. Der Einfluss des Linsendesigns und der operativen Techniken auf die Migration und Proliferation von Linsenepithelzellen wurde in zahlreichen Untersuchungen dokumentiert. Ein weiterer Ansatz zur Nachstarprophylaxe stellt die pharmakologische bzw. molekularbiologische Beeinflussung durch intraokulare Applikation von Pharmaka dar. Zur Modulation der komplexen Vorgänge bei der Nachstarentstehung werden seit den 1980er Jahren unterschiedlichste Strategien wie die Suppression der inflammatorischen Reaktion durch Antiphlogistika sowie die Inhibition der Proliferation, Migration und Matrixsynthese der humanen Linsenepithelzellen durch Antimetabolite, Immuntoxine und Proteinsynthesenblocker oder aber die Inhibition der Adhäsion von hLEZ durch RGD-Peptide verfolgt.

Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe in Rostock zeigten bei in-vitro-Versuchen an humanen Linsenepithelzellen, dass der T-Kalziumkanal-Antagonist Mibefradil zu einer Inhibition der Zelladhäsion bei einer Konzentration ab 10 μM führt. Des Weiteren führte die Wirkung des Pharmakons zu einer Fragmentierung des Aktinzytoskeletts. In zahlreichen Studien wurde versucht, geeignete Trägermaterialien zu entwickeln, die es ermöglichen, ein Pharmakon intraoperativ mit dem Ziel zu installieren, dass der Wirkstoff kontinuierlich über einen längeren Zeitraum freigesetzt wird, um somit eine längere Wirkdauer zu gewährleisten.

Ziel unserer weiterführenden Untersuchungen war es, Mibefradil an einen Kapselspannring zu binden. In Studien zeigten Kapselspannringe eine signifikante Reduktion der Nachstarrate. Die Immobilisierung des T-Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil sowie dessen Koppelung an einen Kapselspannring aus Polymethylmethacrylat (PMMA) ermöglicht es, während der Kataraktchirurgie ein pharmakologisch modifiziertes Trägersystem in den Kapselsack zu implantieren.

Dabei sollen ausschließlich Linsenepithelzellen blockiert werden, ohne anderes Gewebe toxisch zu beeinflussen.

In unseren Untersuchungen prüften wir unter in-vitro-Bedingungen die pharmakologische Wirkung des T-Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil auf die Proliferationshemmung von humanen Linsenepithelzellen.

Gelöstes Mibefradildihydrochlorid wurde nach dem Solvent-Evaporation-Verfahren unter Verwendung von Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) verkapselt. Es wurden sphärische Mikrokapseln mit einem Durchmesser von 20 – 30 µm und einer Wirkstoffbeladung von 38 mg/g synthetisiert. Die Wirkstofffreisetzung wurde mittels UV-Spektroskopie untersucht. Die Linkerchemie zwischen Materialoberfläche und Mikrokapseln basiert auf der Amniolyse von Epoxiden. Mittels Tauchverfahren wurden die Mibefradil-beladenen Mikrokapseln an die PMMA-Oberfläche der Kapselspannringe chemisch angekoppelt. Die Beladung der Kapselspannringe erfolgte mit einer Masse von 2,8 mg und 4,5 mg.

Post mortem aus Spenderaugen entnommene Kapselsäcke wurden nach zirkulärer Kapsulorhexis, nach Entfernung von Kern und Rinde sowie Einbringen eines Kapselspannrings in Zellkultur für durchschnittlich 12 Tage inkubiert. Zellwachstum, Adhäsion auf dem Substrat, Zellmorphologie und Veränderungen im Aktinzytoskelett von hLEZ wurden studiert.

Eine geeignete Methode zum quantitativen Nachweis der Zellproliferation vitaler primärer humaner Linsenepithelzellen stellt die spektrofotometrische Absorption mittels ELISA Reader dar. Die gemessene Extinktion ist direkt proportional zur metabolischen Aktivität. Der MTT-Test (Cell Proliferations Kit) basiert auf der Spaltung des gelben Tetrasoliums Salzes MTT in wasserunlösliche violette Salzkristalle durch metabolisch aktive Zellen. Die Zellen wurden für vier Stunden mit MTT inkubiert und anschließend über Nacht mit der Solubilisierungslösung inkubiert.

Zur Darstellung der Vitalität mittels Live/Dead-Test wurden die Zellen nach dem Waschen mit Ethidium Homodimer und Calcein AM inkubiert und in der Fluoreszenzmikroskopie analysiert (LSM-410, Carl Zeiss).

Die statistische Auswertung erfolgte computergestützt mit dem Programm SPSS 14.0 für Windows. Mit dem T-Test für unabhängige Stichproben wurde ein Vergleich der einzelnen Konzentrationen auf signifikante Unterschiede durchgeführt.

Die Solvent-Evaporations-Methode unter Verwendung von Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) ist ein geeignetes Verfahren zur Immobilisierung des T-Kalziumkanal-

Antagonisten Mibefradildihydrochlorid. Die Mibefradil-beladenen Mikrokapseln setzten den Wirkstoff über 50 Tage frei. Dabei zeigte sich eine lineare Wirkstofffreisetzung von 7,9 mg/l [13,89 μ mol/l] täglich zwischen dem 9. und dem 50. Tag. Am ersten Tag wurden 15,5 mg/l [27,26 μ mol/l] Mibefradil freigesetzt.

Wir konnten zeigen, dass immobilisiertes Mibefradil die Adhäsion der hLEZ hemmt. Bereits eine Konzentration von 10 μ M führte zur Reduktion der Zellfläche und damit zur Hemmung des Zellwachstums. Die Zellen runden sich zunächst ab und lösen sich schließlich von ihrer Unterlage. Die metabolische Aktivität der hLEZ betrug unter Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten nach 24 Stunden nur noch 47,6 %. Die metabolische Aktivität nahm also innerhalb von 24 Stunden um 52,4 % ab. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Mibefradil-Konzentrationen waren dabei statistisch signifikant. Zwischen der Kontrollgruppe und der Mibefradil-Gruppe bestand bei einer Konzentration von 10 μ M ein schwach signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), bei einer Konzentration von 20 μ M und 30 μ M bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$). Damit im Zusammenhang führt der Einfluss der mit Mibefradil-beladenen Mikrokapseln zu einer deutlichen Reduktion vitaler Zellen. Noch vitale Zellen zeigten eine veränderte Zellmorphologie. Abgestorbene Zellen konnten anhand ihrer Kernfluoreszenz nachgewiesen werden. Zudem kam es unter dem Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten zu einer Fragmentierung des Aktinzytoskeletts.

Der T-Kalziumkanal-Antagonist Mibefradil in Form von Immobilisaten führt unter in-vitro-Bedingungen zur Hemmung von proliferierenden hLEZ. Die Möglichkeit, zukünftig im Rahmen der Kataraktchirurgie einen pharmakologisch modifizierten Kapselspannring zu implantieren, der kontinuierlich den Wirkstoff freigibt sowie potenziell toxisch nur auf proliferierende Zellen wirkt, stellt somit eine Chance für die Nachstarprophylaxe dar. Weiterführende Untersuchungen im Organkulturmodell müssen die Freisetzungskinetik des Wirkstoffs näher charakterisieren.

7. Literaturverzeichnis

Abela-Formanek, C., Amon, M., Schild, G., Schauersberger, J., Heinze, G., Kruger, A. (2002) Uveal and capsular biocompatibility of hydrophilic acrylic, hydrophobic acrylic, and silicone intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 28: 50-61.

Abela-Formanek, C., Amon, M., Schauersberger, J., Schild, G., Kolodjaschna, J., Barisani-Asenbauer, T., Kruger A. (2002a) Uveal and capsular biocompatibility of 2 foldable acrylic intraocular lenses in patients with uveitis or pseudoexfoliation syndrome. Comparison to a control group. *J Cataract Refract Surg* 28: 1160-1172.

Akahoshi, T. (1999) 10000 AcrySof implantation. *Proc. ASCRS Symposium on Cataract, IOL and Refractive Surgery*, Seattle, USA, Abstr. p 176.

Agarwal, A., et al. (2003) Sealed-capsule irrigation device. *J Cataract Refract Surg* 29: 2274-2276.

Apple, D.J., Lim, E.S., Morgan, R.C., Tsai, J.C., Gwin, T.D., Brown, S.J., Carlson, A.N. (1990) Preparation and study of human eyes obtained post-mortem with the Miyake posterior photographic technique. *Ophthalmology* 97: 810-816.

Apple, D.J., Solomon, K.D., Tetz, M.R., Assia, E.I., Holland, E.Y., Legler, U.F., Tsai, J.C., Castaneda, V.E., Hoggatt, J.P., Kostick, A.M. (1992) Posterior capsule opacification. *Surv Ophthalmol* 37: 73-116.

Apple, D.J., Rabb, M.F. (1998) Lens and pathology of intraocular lenses. In: Apple, D.J., Rabb, M.F. (eds) *Ocular Pathology*. Mosby, St. Louis, Missouri, S.175.

Apple, D.J., Peng, Q., Visessook, N., Werner, L., Pandey, S.K., Escobar-Gomez, M., Ram, J., Whiteside, S.B., Schoderbeck, R., Ready, E.L., Guindi, A. (2000) Surgical prevention of posterior capsule opacification. Part 1: Progress in eliminating this complication of cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 26: 180-187.

Apple, D.J., Peng, Q., Visessook, N., Werner, L., Pandey, S.K., Escobar-Gomez, M., Ram, J., Auffarth, G.U. (2001) Eradication of posterior capsule opacification: documentation of a marked decrease in Nd:YAG laser posterior capsulotomy rates noted in an analysis of 5416 pseudophakic human eyes obtained postmortem. *Ophthalmology* 108: 505-518.

Aron-Rosa, D., Griesmann, J.-C., Aron, J.-J. (1981) Use of pulse ND:YAGlaser (picosecond) to open the posterior lens capsule in traumatic cataract: a preliminary report. *Ophthalmic Surg* 12: 496-499.

Aslam, T.M., Dhillon, B., Werghi, N., Taguri, A., Wadood, A. (2002) Systems of analysis of posterior capsule opacification. *Br J Ophthalmol* 86: 1181-1186.

Aslam, T.M., Patton, N., Graham, J. (2005) A freely accessible, evidence based, objective system of analysis of posterior capsular opacification; evidence for its validity and reliability. *BMC Ophthalmology* 5: 9 (online).

Auffarth, G.U., Nimsgern, C., Tetz, M.R., Krastel, H., Völcker, H.E. (1997a) Erhöhte Nachstarrate und Besonderheiten der Nd:YAG-Laserkapsulotomie bei Retinitis pigmentosa. *Ophthalmologie* 94: 791-795.

Auffarth, G.U., Tetz, M.R., Krastel, H., Völcker, H.E. (1997b) Erhöhte Nachstarrate nach Kataraktoperation bei Retinitis pigmentosa. In: Vörösmarthy, D., Duncker, G., Hartmann, C. (Hrsg.) 10. Kongress der Deutschsprachigen Gesellschaft für Intraokularlinsen-Implantation und Refraktive Chirurgie (1996, Budapest). Springer, Berlin. S. 340-345.

Auffarth, G.U., Völcker, H.E. (2001) Zur Morphologie der Cataracta secundaria. In: Demeler, U., Völcker, H.E., Auffarth, G.U. (Hrsg.) 15. Kongress der Deutschsprachigen Gesellschaft für Intraokularlinsen-Implantation und refraktive Chirurgie (2001, Bremen). Biermann, Köln. S. 381-384.

- Auffarth, G.U., Becker, K.A. (2002) Cataracta secundaria – Histopathologische Grundlagen, Evaluierungsmethoden und Präventionsmöglichkeiten. *Ophthalmol-Chirurgie* 14: 108-119.
- Auffarth, G.U., et al. (2002) Posterior capsule opacification after implantation of polyfluorocarbon-coated intraocular lenses: a long-term follow-up. *Der Ophthalmol* 34: 202-208.
- Auffarth, G.U., Rabsilber, T.M., Reuland, A.J. (2005) Neue Methoden der Nachstarprävention. *Ophthalmologie* 102: 579-586.
- Azuma, N., Hara, T., Hara, T. (1998) Extracellular matrix of opacified anterior capsule after endocapsular cataract surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 236: 531-536.
- Bakunowicz-Lazarczyk, A., Stankiewicz, A., Urban, B., Sredzinska-Kita, D. (1996) [Cataract surgery results with intraocular lens implantation in children and youth in the years 1990-1995]. [polnisch] *Klin Oczna* 98: 295-297.
- Barman, S.A., Hollick, E.J., Boyce, J.F., Spalton, D.J., Uyyanonvara, B., Sanguinetti, G., Meacock, W. (2000) Quantification of Posterior Opacification in Digital Images after Cataract Surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 3882-3892.
- Barnes, P.A., Rieckhoff, K.E. (1968) Laser-induced underwater sparks. *Appl Phys Letters* 13: 282-284.
- Bath, P.E., Hoffer, K.J., Aron-Rosa, D., Dang, Y. (1987) Glare disability secondary to intraocular lens damage. *J Cataract Refract Surg* 13: 309-313.
- Beck, R., Nebe, B., Rychly, J., Guthoff, R. (2000) Inhibition der Adhäsion von Linsenepithelzellen durch den Calcium-Kanalblocker Mibefradil. In: Wenzel, M., Kohnen, T., Blumer, B. (Hrsg.) 14. Kongress der Deutschsprachigen Gesellschaft für Intraokularlinsen-Implantation und refraktive Chirurgie. Biermann, Köln. S. 473-479.
- Beck, R., Nebe, B., Guthoff, R., Rychly, J. (2001) Inhibition of lens epithelial cell adhesion by the calcium antagonist mibefradil correlates with impaired integrin distribution and organization of the cytoskeleton. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239: 452-458.
- Beck, R., Kunz, F., Nebe, B., Sternberg, K., Guthoff, R. (2004) In-vitro-Versuche zum Einfluss von an PMMA gebundenem Mibefradil auf die Adhäsion humaner Linsenepithelzellen. In: Demeler, U., Völcker, H.E., Auffarth, G.U. (Hrsg.) 16. Kongress der Deutschsprachigen Gesellschaft für Intraokularlinsen-Implantation und refraktive Chirurgie. Biermann, Köln. S. 255-260.
- Behar-Cohen, F.F., et al. (1995) In vivo inhibition of lens regrowth by fibroblast growth factor 2-saporin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 2434-2448.
- Bell, C.E., Landt, J.A. (1967) Laser-induced high-pressure shock waves in water. *Appl Phys Letters* 10: 46-48.
- Bertelmann, E., Kojetinsky, C. (2001) Posterior capsule opacification and anterior capsule opacification. *Curr Opin Ophthalmol* 12: 35-40.
- Bhermi, G.S., Spalton, D.J., El-Osta, A.A.R., Marshall, J. (2002) Failure of a discontinuous bend to prevent lens epithelial cell migration in vitro. *J Cataract Refract Surg* 28: 1256-1261.
- Biswas, N.R., et al. (1999) Animal study on the effects of catalin an aftercataract and posterior capsule opacification. *Ophthalmic Res* 31: 140-142.
- Born, C.P., Ryan, D.K. (1990) Effect of intraocular lens optic design on posterior capsular opacification. *J Cataract Refract Surg* 16: 188-192.

- Brady, K.M., Atkinson, C.S., Kilty, L.A., Hiles, D.A. (1995) Cataract surgery and intraocular lens implantation in children. *Am J Ophthalmol* 120: 1-9.
- Bretton, R.H., et al. (1999) Use of a polylysine-saporin conjugate to prevent posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 25: 921-929.
- Bretton, R.H., Kash, R.L., Schanzlin, D.J. (2002) Use of bipolar diathermy to prevent posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 28: 866-873.
- Buehl, W., Findl, O., Menapace, R., Georgopoulos, M., Rainer, G., Wirtitsch, M., Siegl, H., Pinz, A. (2002a) Reproducibility of standardized retroillumination photography for quantification of posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 28: 265-270.
- Buehl, W., Findl, O., Menapace, R., Rainer, G., Sacu, S., Kiss, B., Petternal, V., Georgopoulos, M. (2002b) Effect of an acrylic intraocular lens with a sharp posterior optic edge on posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 28: 1105-1111.
- Buehl, W., Findl, O., Menapace, R., Sacu, S., Kriechbaum, K., Koeppl, C., Wirtitsch, M. (2005) Long-term effect of optic edge design in an acrylic intraocular lens on posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 31: 954-961.
- Buehl, W., Sacu, S., Findl, O. (2005a) Association Between Intensity of Posterior Capsule Opacification and Contrast Sensitivity. *Am J Ophthalmology* 140: 927-930.
- Caporossi, A., Casprini, F., Tosi, G.M., Balestazzi, A., Stumpo, M., Toti, P. (1998) Histology of anterior capsule fibrosis following phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg* 24: 1343-1346.
- Ceschi, G.P., Artaria, L.G. (1998) Clear lens extraction (CLE) zur Korrektur der hochgradigen Myopie. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 212: 280-282.
- Chirila, T.V., et al. (1995) Melanin-containing hydrogel intraocular lenses: a histopathological study in animal eyes. *J Biomater Appl* 9: 262-274. Chung, H.S., Lim, S.J., Kim, H.B. (2000) Effect of mitomycin-C on posterior capsule opacification in rabbit eyes. *J Cataract Refract Surg* 26: 1537-1542.
- Clark, D.S., Emery, J.M., Munsell, M.F. (1998) Inhibition of posterior capsule opacification with an immunotoxin specific for lens epithelial cells: 24 month clinical results. *J Cataract Refract Surg* 24: 1614-1620.
- Colin, J., Robinet, A., (1997) Clear lensectomy and implantation of a low-power posterior chamber intraocular lens for correction of high myopia. A four-year follow-up. *Ophthalmology* 104: 73-78.
- Cortina, P., et al. (1997) Diclofenac sodium and cyclosporine A inhibit human lens epithelial cell proliferation in culture. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 235: 180-185.
- Crosson, C.E., Kelleher, P.J., Man-Kit Lam, D. (1992) Ocular Pharmacokinetics of Lens Epithelial Cell-specific Immunotoxin 4197X-RA. *Exp Eye Res* 55: 87-91.
- Crowston, J.G., Healey, P.R., Hopley, C., Neilson, G., Milverton, E.J., Maloof, A. (2004) Water-mediated lysis of lens epithelial cells attached to lens capsule. *J Cataract Refract Surg* 30: 1102-1106.
- Dana, M.R., Chatzistefanou, K., Schaumberg, D.A., Foster, C.S. (1997) Posterior capsule opacification after cataract surgery in patients with uveitis. *Ophthalmology* 104: 1387-1393.
- Davidson, M.G., et al. (1998) Transferrin in aftercataract and as a survival factor for lens epithelium. *Exp Eye Res* 66: 207-215.

- Davis, P.L., Hill, P. (1989) Inhibition of capsule opacification by convex surface posterior three-piece all-PMMA C-loop lenses: a fellow eye and same lens study. *Eur J Implant Refract Surg* 1: 237-240.
- Davison, J. A. (2002) Clinical performance of Alcon SA30AL and SA60AT singlepiece acrylic intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 28: 1112-1123.
- de Souza, O.F., et al. (1995) Inhibition of experimental proliferative vitreoretinopathy in rabbits by suramin. *Ophthalmologica* 209: 212-216.
- Dick, B., Schwenn, O., Pfeiffer, N. (1997) Schadensausmaß bei verschiedenen Intraokularlinsen durch die Neodymium:YAG-Laser Behandlung – Eine experimentelle Studie. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 211: 263-271.
- Dick, H.B. (2005) Closed foldable capsular rings. *J Cataract Refract Surg* 31: 467-471.
- Duncan, G., Wormstone, I.M., Liu, C.S.C., Marcantonio, J.M., Davies, P.D. (1997) Thapsigargin-coated intraocular lenses inhibit human lens cell growth. *Nature Medicine* 3: 1026-1028.
- Dureau, P., Massin, P., Chaine, G., Molcard, C., Ergina, A. Gaudric, A. (1997) [Extracapsular extraction and posterior chamber implantations in diabetics. Prospective study of 198 eyes] (französisch). *J Fr Ophtalmol* 20: 117-123.
- Eckstein, M., Vijayalakshmi, P., Killedar, M., Gilbert, C., Foster, A. (1998) Use of intraocular lenses in children with traumatic cataract in south India. *Br J Ophthalmol* 82: 911-915.
- El-Osta, A.A.R., Spalton, D.J., Marshall, J. (2003) In vitro model for the study of human posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 29: 1593-1600.
- Fernandez, V., Fragoso, M.A., Billotte, C., et al. (2004) Efficacy of various drugs in the prevention of posterior capsule opacification: experimental study of rabbit eyes. *J Cataract Refract Surg* 30: 2598-2605.
- Ficker, L.A., Steele, A.D. (1985) Complications of Nd:YAG laser posterior capsulotomy. *Trans Ophthalmol Soc U.K.* 104: 529-532.
- Findl, O., Drexler, W., Menapace, R., Georgopoulos, M., Rainer, G., Hitzengerger, C.K., Fercher, A.F. (1999) Changes in intraocular lens position after neodymium:YAG capsulotomy. *J Cataract Refract Surg* 25: 659-662.
- Findl, O., Buehl, W., Menapace, R., Georgopoulos, M., Rainer, G., Siegl, H., Kaider, A., Pinz, A. (2003) Comparison of 4 methods for quantifying posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 29: 106-111.
- Findl, O., Menapace, R., Sacu, S., Buehl, W., Rainer, G. (2005) Effect of optic material on posterior capsule opacification in intraocular lenses with sharp-edge optics. *Ophthalmology* 112: 67-72.
- Findl, O., Buehl, W., Menapace, R., Sacu, S., Georgopoulos, M., Rainer, G. (2005) Long-term Effect of Sharp Optic Edges of a Polymethyl Methacrylate Intraocular Lens on Posterior Capsule Opacification. *Ophthalmology* 112: 2004-2008.
- Flach, A.J., Dolan, B.J. (2000) Incidence of postoperative posterior capsule opacification following treatment with diclofenac 0,1% and ketorolac 0,5% ophthalmic solutions: 3-year randomized, double-masked, prospective clinical investigation. *Trans Am Ophthalmol Soc* 98: 101-105; discussion 105-107.
- Fourman, S., Apisson, J. (1991) Late-onset elevation in intraocular pressure after Neodymium-YAG laser posterior capsulotomy. *Arch Ophthalmol* 109: 511-513.

- Fradin, D.W., Bloembergen, N., Letellier, J.P. (1973) Dependence of laserinduced breakdown field strength on pulse duration. *Appl Phys Letters* 22: 635-637.
- Friedman, D.S., Duncan, D.D., Munoz, B., West, S.K., Schein, O.D. (1999) Digital image capture and automated analysis of posterior capsular opacification. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 1715-1726.
- Gavrilova-Ruch, O., Schonherr, K., Gessner, G., Schonherr, R., Klapperstuck, T., Wohlrab, W., Heinemann, S.H. (2002) Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. *Membrane Biol* 188: 2, 137-49.
- Geissler, F.T., Li, D.W.-C., James, E.R. (2001) Inhibition of Lens Epithelial Cell Growth by Induction of Apoptosis: Potential for Prevention of Posterior Capsule Opacification. *J Ocul Pharm* 17: 587-596.
- Gills, J.P. (2004) Effect of lidocaine on lens epithelial cells. *J Cataract Refract Surg* 30: 1153-1154.
- Glaesser, D., Iwig, M. (1990) A combined adenine-phosphate effect inhibits the reactivation of eye lens epithelial cells in primary culture. *Biomed Biochim Acta* 49: 1139-1146.
- Goins, K.M., Ortiz, J.R., Fulcher, S.F.A., et al. (1994) Inhibition of proliferating lens epithelium with antitransferrin receptor immunotoxin. *J Cataract Refract Surg* 20: 513-516.
- Gordon-Thomson, C., de longh, R.U., Hales, A.M., Chamberlain, C.G., McAvoy, J.W. (1998) Differential cataractogenic potency of TGF-beta1, -beta2, and -beta3 and their expression in the postnatal rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 1399-1409.
- Goto, Y., Ibaraki, N., Miyake, K. (2003) Human lens epithelial cells damage and stimulation of their secretion of chemical mediators by benzalkonium chloride rather than latanoprost and timolol. *Arch Ophthalmol* 121: 835-839.
- Greite, J.H., et al. (1989) Osmo-Lavage zur Nachstarverhütung. In: Freyler, H., Skorpik, C., Grasl, M. (Hrsg.) 3. Kongress der Deutschsprachigen Gesellschaft für Intraokularlinsen Implantation. Springer, Wien. S. 197-207.
- Guo, L., Zhang, X., Zhang, S. (2002) An experimental study of inhibition of tetrandrine on posterior capsule opacification in rabbits. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 38: 235-238.
- Hansen, S.O., Solomon, K.D., McKnight, G.T., Wilbrandt, T.H., Gwin T.D., O'Morchoe, D.J., Tetz, M.R., Apple, D.J. (1988) Posterior capsular opacification and intraocular lens decentration. Part 1. Comparison of various posterior chamber lens designs implanted in the rabbit model. *J Cataract Refract Surg* 14: 605-613.
- Hansen, T.E., Otland, N., Corydon, L. (1988) Posterior capsule fibrosis and intraocular lens design. *J Cataract Refract Surg* 14: 383-386.
- Hartmann, C., et al. (1989) In-vitro-Veränderungen des Linseneithels und Hornhautendothels durch das Zytostatikum Daunomycin. *Fortschr Ophthalmol* 86: 167-171.
- Hartmann, C., Wiedemann, P., Gothe, K., Weller, M., Heimann, K. (1990a) Prévention de la cataracte secondaire par application endocapsulaire del ántimétotique daunomycine. *Ophtalmologie* 4: 102-106.
- Hartmann, C., Wiedemann, P., Gothe, K., Weller, M., Heimann, K. (1990b) Nachstarprävention durch endokapsuläre Daunomycinapplikation. In: Freyler, H., Skorpik, C., Grasl, M. (Hrsg.) 3. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Intraokularlinsen Implantation. Springer, Wien. S. 414-422.
- Haus, C.M., Galand, A.L. (1996) Mitomycin against posterior capsule opacification: an experimental study in rabbits. *Br J Ophthalmol* 80: 1087-1091.

- Hayashi, H., Hayashi, K., Nakao, F., Hayashi, F. (1998a) Area reduction in the anterior capsule opening in eyes of diabetes mellitus patients. *J Cataract Refract Surg* 24: 1105-1110.
- Hayashi, H., Hayashi, K., Nakao, F., Hayashi, F. (1998b) Quantitative comparison of posterior capsule opacification after polymethylmethacrylate, silicone and soft acrylic intraocular lens implantation. *Arch Ophthalmol* 116: 1579-1582.
- Hayashi, H., Hayashi, K., Nakao, F., Hayashi, F. (1998c) Reproducibility of posterior capsule opacification measurement using Scheimpflug videophotography. *J Cataract Refract Surg* 24: 1632-1635.
- Hayashi, K., Hayashi, H., Nakao, F., Hayashi, F. (1998) In vivo quantitative measurement of posterior capsule opacification after extracapsular cataract surgery. *Am J Ophthalmol* 125: 837-843.
- Hayashi, K., Hayashi, H., Nakao, F., Hayashi, F. (2001) Changes in posterior capsule opacification after poly(methylmethacrylate), silicone, and acrylic intraocular lens implantation. *J Cataract Refract Surg* 27: 817-824.
- Hayashi, K., Hayashi, H., Nakao, F., Hayashi, F. (2002) Posterior capsule opacification after cataract surgery in patients with diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol* 134: 10-16.
- Health Care Financing Administration (2000) The 1998 Medicare Frequency Data tables. Washington: U.S. department of health & human services.
- Hepsen, I.F., Bayramlar, H., Gultek, A., Ozen, S., Tilgen, F., Evereklioglu, C. (1997) Caffeic acid phenethyl ester to inhibit posterior capsule opacification in rabbits. *J Cataract Refract Surg* 23: 1572-1576.
- Hollick, E.J., Spalton, D.J., Ursell, P.G., Pande M.V. (1998a) Biocompatibility of poly(methylmethacrylate), silicone, and AcrySof intraocular lenses: Randomized comparison of the cellular reaction on the anterior lens surface. *J Cataract Refract Surg* 24: 361-366.
- Hollick, E.J., Spalton, D.J., Ursell, P.G., Pande M.V. (1998b) Lens epithelial cell regression on the posterior capsule with different intraocular lens materials. *Br J Ophthalmol* 82: 1182-1188.
- Hollick, E.J., Spalton, D.J., Meacock, W.R. (1999a) The effect of capsulorhexis size on posterior capsular opacification; one-year results of a randomized prospective trial. *Am J Ophthalmol* 128: 271-279.
- Hollick, E.J., Spalton, D.J., Ursell, P.G., Pande M.V., Barman, S.A., Boyce, J.F., Tilling, K. (1999b) The effect of polymethylmethacrylate, silicone, and polyacrylic intraocular lenses on posterior capsule opacification 3 years after cataract surgery. *Ophthalmology* 106: 49-55.
- Humphry, R.C., et al. (1988) The human anterior lens capsule – an attempted chemical debridement of epithelial cells by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and trypsin. *Br J Ophthalmol* 72: 406-408.
- Hunhold, W., Wirtz, M., Kreiner, C., et al. (1991) Linsen-Epithel-Nekrose-Faktor (LENF) zur Nachstar- verhütung. *Fortschr Ophthalmol* 88: 386-389.
- Ignjatovic, Z. (1998) [Secondary cataracts in extreme myopia] [serbo-kroatisch]. *Srp Arh Celok Lek* 126: 239-241.
- Inan, U.U., Ozturk, F., Kaynak, S., et al. (2001) Prevention of posterior capsule opacification by intraoperative single-dose pharmacologic agents. *J Cataract Refract Surg* 27: 1079-1087.
- Inan, U.U., et al. (2001) Prevention of posterior capsule opacification by retinoic acid and mitomycin. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 239: 693-697.

- Ishida, I., Saika, S., Ohnishi, Y. (2001) Effect of minoxidil on rabbit lens epithelial cell behaviour in vitro and in situ. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 239: 770-777.
- Ismail, M.M., Alió, J.L., Moreno, J.M.R. (1996) Prevention of secondary cataract by antimitotic drugs: experimental study. *Ophthalmic Res* 28: 64-69.
- Izák, M., Oslanec, J., Gafrikova, J. (1996) [Extraction of a clear lens-cataract as refractive surgery in severe myopia] [tschechoslowakisch]. *Cesk Slov Oftalmol* 52: 82-87.
- Jacob, T.J.C., Humphrey, R.C., Davies, E.G., Thompson, G.M. (1987) Cytological factors relating to posterior capsule opacification following cataract surgery. *Br J Ophthalmol* 71: 659-663.
- Jahn, C.E., Emke, M. (1996) Long-term elevation of intraocular pressure after Neodymium:Yag laser posterior capsulotomy. *Ophthalmologica* 210: 85-89.
- Javdani, S.M., Huygens, M.M., Callebaut, F. (2002) Neodymium:YAG capsulotomy rates after phacoemulsification with hydrophobic and hydrophilic acrylic intraocular lenses. *Bull Soc Belge Ophthalmol* 283: 13-17.
- Jimenez-Alfaro, I., Miguelez, S., Bueno, J.L., Puy, P. (1998) Clear lens extraction and implantation of negative-power posterior chamber intraocular lenses to correct extreme myopia. *J Cataract Refract Surg* 24: 1310-1316.
- Jose, R.M.J., Bender, L.E., Boyce, J.F., Heatly, C. (2005) Correlation between the measurement of posterior capsule opacification severity and visual function testing. *J Cataract Refract Surg* 31: 534-542.
- Joussen, A.M., Huppertz, B., Koch, H.R., Kernert, N., Camphausen, K., Schlosser, K., Foerster, A.M., Kruse, F.E., Lappas, A., Kirchhof, B. (2001) Low-dose-rate ionizing irradiation for inhibition of secondary cataract formation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49: 817-825.
- Kato, S., Oshika, T., Numaga, J., Hayashi, Y., Oshiro, M., Yuguchi, T., Kaiya, T. (2001) Anterior capsular contraction after cataract surgery in eyes of diabetic patients. *Br J Ophthalmol* 85: 21-23.
- Kelman, C.D. (1967) Phaco-emulsification and aspiration: a new technique of cataract removal. *Am J Ophthalmol* 64: 23-25.
- Khan, A.J., Percival, P.B. (1999) 12 years results of a prospective trial comparing poly (methyl methacrylate) and poly (hydroxyethyl methacrylate) intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 25: 1404-1407.
- Kim, J.T., et al. (2002) Inhibitory effects of salmosin, a disintegrin, on posterior capsule opacification in vitro and in vivo. *Exp Eye Res* 74: 585-594.
- Kim, J.T., Lee, E.H., Chung, K.H., Kang, I.C., Lee, D.H., Joo, C.K. (2004) Transdifferentiation of Cultured Bovine Lens Epithelial Cells into Myofibroblast-like Cells by Serum Modulation. *Yonsei Medical Journal* 45: 380-391.
- Kim, K., Lee, B.-H., Kim, I.-S. (1992) The measurement of fibronectin concentration in human aqueous humor. *Korean J Ophthalmol* 6: 1-5.
- Klemen, U.M., Walkow, T. (2002) Der Kapselspannung: Entwicklung, Indikationen, Implantation und Zukunft. *Ophthalmochirurgie* 14: 44-48.
- Knight-Nanan, D., O'Keefe, M., Howell, R. (1996) Outcome and complications of intraocular lenses in children with cataract. *J Cataract Refract Surg* 22: 730-736.

- Knighon, R.W., Slomovic, A.R., Parrish, R.K. 2nd. (1985) Glare measurements before and after neodymium-YAG laser posterior capsulotomy. *Am J Ophthalmol* 100: 708-713.
- Kohnen, S., Brauweiler, P. (1996) First results of cataract surgery and implantation of negative power intraocular lenses in highly myopic eyes. *J Cataract Refract Surg* 22: 416-420.
- Kojetinsky, C., Baatz, H., Pleyer, U., Hartmann, C., Rieck, P. (2001) In-vitro-Untersuchungen an bovinen und humanen Linsenepithelzellkulturen zur Nachstarhemmung mittels eines zyklischen RGD-Peptids. *Ophthalmologie* 98: 731-735.
- Krishna, R., Meisler, D.M., Lowder, C.Y., Estafanous, M., Foster, R.E. (1998) Long-term follow-up of extracapsular cataract extraction and posterior chamber intraocular lens implantation in patients with uveitis. *Ophthalmology* 105: 1765-1769.
- Krishnamachary, M., Rath, V., Gupta, S. (1997) Management of traumatic cataract in children. *J Cataract Refract Surg* 23: 681-687.
- Kruger, A.J., Schauersberger, J., Abela, C., Schild, G., Amon, M. (2000) Two year results: Sharp versus rounded optic edges on silicone lenses. *J Cataract Refract Surg* 26: 566-570.
- Küchle, M., Amberg, A., Martus, P., Nguyen, N.X., Naumann G.O.H. (1997) Pseudoexfoliation syndrome and secondary cataract. *Br J Ophthalmol* 81: 862-866.
- Kücüksümer, Y., Bayraktar, S., Sahin, S., Yilmaz, F. (2000) Posterior capsule opacification 3 years after implantation of an AcrySof and a MemoryLens in fellow eyes. *J Cataract Refract Surg* 26: 1176-1182.
- Kurosaka, D., Nagamoto, T. (1994) Inhibitory effect of TGF- β 2 in human aqueous humor on bovine lens epithelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3408-3412.
- Kurosaka, D., Obasawa, M., Kurosaka, H., Nakamura, K. (2002) Inhibition of Lens Epithelial Cell Migration by an Acrylic Intraocular Lens in vitro. *Ophthalmic Res* 34: 29-37.
- Lasa, M.S., Datiles, M.B. 3rd, Magno, B.V., Mahurkar, A. (1995) Scheimpflug photography and postcataract surgery posterior capsule opacification. *Ophthalmic Surg* 26: 110-113.
- Latz, C., Migonney, V., Pavon-Djavid, G., Rieck, P., Hartmann, C., Renard, G., Legeais, J.M. (2000) Inhibition of lens epithelial cell proliferation by substituted PMMA intraocular lenses. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238: 696-700.
- LeClaire, J., Nadler, M.P., Weiss, S. Miller, D. (1982) A new glare tester for clinical testing. Results comparing normal subjects and variously corrected aphakic patients. *Arch Ophthalmol* 100: 153-158.
- Lee, J.H., et al. (2002) Tetrandrine-induced cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. *Int J Oncol* 21: 1239-1244.
- Lee, K.H., Lee, J.H. (1996) Long-term results of clear lens extraction for severe myopia. *J Cataract Refract Surg* 22: 1411-1415.
- Legler, U.F., Apple, D.J., Assia, E.I., Bluestein, E.C., Castaneda, V.E., Mowbray, S.L. (1993) Inhibition of posterior capsule opacification: the effect of colchicine in a sustained drug delivery system. *J Cataract Refract Surg* 19: 462-470.
- Liekfeld, A., Pahms, N., Torun, N., Porstmann, A.U., Jaroszewski, J., Hartmann, C. (2005) Evaluation of a human capsular bag model for secondary cataract determination after intraocular lens implantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 243: 43-48.

- Lindstrom, R.L., Lindquist, T.D., Huldin, J., Rubenstein, J.B. (1988) Retinal detachment in axial myopia following extracapsular cataract surgery. In: Caldwell, D.R. (Hrsg.) *Cataracts: Transactions of the New Orleans Academy of Ophthalmology*, S. 253-268.
- Linnola, R.J., Salonen, J.I., Happonen, R.-P. (1999) Intraocular lens bioactivity tested using rabbit corneal tissue cultures. *J Cataract Refract Surg* 25: 1480-1485.
- Linnola, R.J., Werner, L., Pandey, S.K., Escobar-Gomez, M., Znoiko, S.L., Apple, D.J. (2000a) Adhesion of fibronectin, vitronectin, laminin, and collagen type IV to intraocular lens materials in pseudophakic human autopsy eyes, Part 1: Histological sections. *J Cataract Refract Surg* 26: 1792-1806.
- Linnola, R.J., Werner, L., Pandey, S.K., Escobar-Gomez, M., Znoiko, S.L., Apple, D.J. (2000b) Adhesion of fibronectin, vitronectin, laminin, and collagen type IV to intraocular lens materials in pseudophakic human autopsy eyes, Part 2: Explanted intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 26: 1807-1818.
- Liu, C.S.C., Wormstone, I.M., Duncan, G., Marcantonio, J.M., Webb, S.F., Davies, P.D. (1996) A Study of Human Lens Cell Growth In Vitro. A Model for Posterior Capsule Opacification.
- Lyle, W.A., Jin G.J. (1996) Phacoemulsification with intraocular lens implantation in high myopia. *J Cataract Refract Surg* 22: 238-242.
- Magno, B.V., Datiles, M.B., Lasa, M.S.M., Fajardo, M.O.Q., Caruso, R.C., Kaiser-Kupfer, M.I. (1997) Evaluation of visual function following neodymium:YAG laser posterior capsulotomy. *Ophthalmology* 104: 1287-1293.
- Majima, K. (1995) Cell biological analysis of the human cataractous lens: implication of lens epithelial cells in the development of aftercataract. *Ophthalmic Res* 27: 202-207.
- Malecaze, F., Couderc, B., de Neuville, S., Serres, B., Mallet, J., Douin-Echinard, V., Manenti, S., Revah, F., Darbon, J.M. (1999) Adenovirus-mediated suicide gene transduction: feasibility in lens epithelium and in prevention of posterior capsule opacification in rabbits. *Hum Gene Ther* 10: 2365-2372.
- Maloof, A., Neilson, Milverton, E.J., Pandey, S.K. (2003) Selective and specific targeting of lens epithelial cells during cataract surgery using sealed-capsule irrigation. *J Cataract Refract Surg* 29: 1566-1568.
- Malukiewicz-Wisniewska, G., Kaluzny, J., Lesiewska-Junk, H. (1996) Intraocular lens implantation in myopic eyes. *Eur J Ophthalmol* 6: 356-360.
- Malukiewicz-Wisniewska, G., Kaluzny, J., Lesiewska-Junk, H., Eliks, I. (1999) Intraocular lens implantation in children and youth. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 36: 129-133.
- Mamalis, N., Crandall, A.S., Linebarger, E., Sheffield, W.K., Leidenix, M.J. (1995) Effect of intraocular lens size on posterior capsule opacification after phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg* 21: 99-102.
- Mansfield, K.J., Cerra, A., Chamberlain, C.G. (2004) FGF-2 counteracts loss of TGFbeta affected cells from rat lens explants: implications for PCO (aftercataract). *Mol Vis* 10: 521-532.
- Mansfield, K.J., Cerra, A., Chamberlain, C.G. (2004) Effects of dexamethasone on posterior capsule opacification-like changes in a rat lens explant model. *Mol Vis* 10: 728-737.
- Marcantonio, J.M., Rakic, J.-M., Vrensen, G.F.J.M., Duncan, G. (2000) Lens Cell Populations Studied in Human Donor Capsular Bags with Implanted Intraocular Lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 1130-1141.

- Mastropasqua, L., Lobefalo, L., Ciancaglini, M., et al. (1997) Heparin eyedrops to prevent posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 23: 440-446.
- Matsushima, H., et al. (2004) Effects of calcium on human lens epithelial cells in vitro. *Jpn J Ophthalmol* 48: 97-100.
- McAvoy, J., Chamberlain, C. (1989) Fibroblast growth factor (FGF) induces different responses in lens epithelial cells depending on its concentration. *Development* 107: 221-228.
- McDonell, P.J., Rowen, S.L., Glaser, B.M., Sato, M. (1985) Posterior Capsule Opacification. An In Vitro Model. *Arch Ophthalmol* 103: 1378-1381.
- McDonell, P.J., Krause, W., Glaser, B.M. (1988) In vitro inhibition of lens epithelial cell proliferation and migration. *Ophthalmic Surg* 19: 25-30.
- Meacock, W.R., et al. (2000) Double-masked prospective ocular safety study of a lens epithelial cell antibody to prevent posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 26: 716-721.
- Meacock, W.R., Spalton, D.J., Boyce, J.F., Jose, R.M. (2001) Effect of optic size on posterior capsule opacification: 5,5 mm versus 6,0 mm AcrySof intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 27: 1194-1198.
- Melendez, R.F., et al. (2005) Photodynamic actions of indocyanine green and trypan blue on human lens epithelial cells in vitro. *Am J Ophthalmol* 140: 132-134.
- Menapace, R., Findl, O., Rainer, G., Georgopoulos, M., Vass, C., Nishi, O. (1999) Kapselknickringimplantation zur Nachstarverhütung – Prinzip, Technik, Studiendesign und Ergebnisse. In: Duncker, G., Ohrloff, C., Wilhelm, F. (Hrsg.) 12. Kongress der Deutschsprachigen Gesellschaft für Intraokularlinsen Implantation und Refraktive Chirurgie. Springer, Berlin. S.181.
- Menapace, R. (2007) Nachstarbildung nach Intraokularlinsenimplantation. Teil 1: Genese und Prävention durch Optimierung konventioneller Linsenimplantate und Operationstechniken. *Ophthalmologie* 104: 253-264.
- Menapace, R. (2007) Nachstarbildung nach Intraokularlinsenimplantation. Teil 2: Prävention mittels alternativer Implantate und Techniken. *Ophthalmologie* 104: 345-356.
- Milazzo, S., Turut, P., Bassam, A., Charlin, J.-F. (1996) Long-term follow-up of three-piece, looped, silicone intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 22 (Suppl 2): 1259-1262.
- Miyake, K. (1996a) The significance of inflammatory reactions following cataract extraction and intraocular lens implantation. *J Cataract Refract Surg* 22 (Suppl 1): 759-763.
- Moreno-Montañés, J., Alvarez, A., Maldonado, M.J. (2005) Objective Quantification of Posterior Capsule Opacification after Cataract Surgery, with Optical Coherence Tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 3999-4006.
- Nagamoto, T., Hara, E. (1996) Lens epithelial cell migration onto the posterior capsule in vitro. *J Cataract Refract Surg* 22 (Suppl 1): 841-846.
- Nagamoto, T., Hara, E., Kurosaka, D. (1996) Lens cell proliferation onto the intraocular lens optic in vitro. *J Cataract Refract Surg* 22 (Suppl 1): 847-851.
- Nagamoto, T., Eguchi, G. (1997) Effect of intraocular lens design on migration of lens epithelial cells onto the posterior capsule. *J Cataract Refract Surg* 23: 866-872.

Naumann, G.O.H. (Hrsg.) (1997) Pathologie des Auges. Band II. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg; 845-894.

Nebe, B., Kunz, F., Peters, A., Rychly, J., Noack, T., Beck, R. (2004) Induction of apoptosis by the calcium antagonist mibefradil correlates with depolarisation of the membrane potential and decreased integrin expression in human lens epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242: 597-604.

Neuhann, T. (1987) Theorie und Operationstechnik der Kapsulorhexis. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 190: 542-545.

Newland, T.J., Auffarth, G.U., Wesendahl, T.A., Apple, D.J. (1994) Neodymium:YAG laser damage on silicone intraocular lenses. A comparison of lesions on explanted lenses and experimentally produced lesions. *J Cataract Refract Surg* 20: 527-533.

Newland, T.J., McDermott, M.L., Elliott, D., Hazlett, L.D., Apple, D.J., Lambert, R.J., Barret, P.R. (1999) Experimental neodymium:YAG laser damage to acrylic, poly(methylmethacrylate), and silicone intraocular lens materials. *J Cataract Refract Surg* 25: 72-76.

Neylon, C.B. (2002) Potassium channels and vascular proliferation. *Vascul Pharmacol* 38: 1, 35-41.

Nimsgern, C., Tetz, M.R., Auffarth, G.U., Völcker, H.E. (1999) Computergestützte Evaluation der Nachstardichte mittels EPCO: Eine Reliabilitätsprüfung. In: Duncker, G., Ohrloff, C., Wilhelm, F. (Hrsg.) 12. Kongress der Deutschsprachigen Gesellschaft für Intraokularlinsen Implantation und Refraktive Chirurgie (1998). Springer, Berlin. S. 192-197.

Nishi, O., Nishi, K., Hikida, M. (1993) Removal of lens epithelial cells following loosening of the junctional complex. *J Cataract Refract Surg* 19: 56-61.

Nishi, O., et al. (1995) Effects of diclofenac sodium and indomethacin on proliferation and collagen synthesis of lens epithelial cells in vitro. *J Cataract Refract Surg* 21: 461-465.

Nishi, O., et al. (1995) Effect of indomethacin-coated posterior chamber intraocular lenses on postoperative inflammation and posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 21: 574-578.

Nishi, O., Nishi, K., Imanishi, M., Mano, C., Yamada, Y., Tada, Y., Shirasawa, E., Härfstrand, A. (1996a) Decreased prostaglandin E2 synthesis by lens epithelial cells cultured on heparin-surface-modified poly (methyl methacrylate). *J Cataract Refract Surg* 22 (suppl 1): 859-862.

Nishi, O., Nishi, K., Ohmoto, Y. (1996b) Synthesis of interleukin-1, interleukin-6, and basic fibroblast growth factor by human cataract lens epithelial cells. *J Cataract Refract Surg* 22 (suppl 1): 852-853.

Nishi, O., Nishi, K., Takakazu, M., Tada, Y., Shirasawa, E., Sakanishi, K. (1996c) Effect of intraocular sustained release of indomethacin on postoperative inflammation and posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 22 (suppl 1): 806-810.

Nishi, O., et al. (1996) Inhibition of migrating lens epithelial cells by sustained release of ethylenediaminetetraacetic acid. *J Cataract Refract Surg* 22 (suppl 1): 863-868.

Nishi, O., et al. (1997) Inhibition of migrating lens epithelial cells by blocking the adhesion molecule integrin: a preliminary report. *J Cataract Refract Surg* 23: 860-865.

Nishi, O., Nishi, K., Akaishi, T., Shirasawa, E. (1997) Detection of cell adhesion molecules in lens epithelial cells of human cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 579-585.

Nishi, O., Nishi, K., Sakanishi, K. (1998a) Inhibition of migrating lens epithelial cells at the capsular bend created by rectangular optic edge of a posterior chamber intraocular lens. *Ophthalmic Surg Lasers* 29: 587-594.

- Nishi, O., Nishi, K., Menapace, R. (1998b) Capsule-bending ring for prevention of capsular opacification: a preliminary report. *Ophthalmic Surg Lasers* 29: 749-753.
- Nishi, O., Nishi, K., Mano, C., Ichihara, M., Honda, T. (1998c) The inhibition of lens epithelial cell migration by a discontinuous capsular bend created by a bandshaped circular loop or a capsule-bending ring. *Ophthalmic Surg Lasers* 29: 119-125.
- Nishi, O. (1999a) Posterior capsule opacification. Part I: Experimental investigations. *J Cataract Refract Surg* 25: 106-117.
- Nishi, O., Nishi, K. (1999b) Preventing posterior capsule opacification by creating a discontinuous sharp bend in the capsule. *J Cataract Refract Surg* 25: 521-526.
- Nishi, O., Nishi, K., Wickström, K. (2000) Preventing lens epithelial cell migration using intraocular lenses with sharp rectangular edges. *J Cataract Refract Surg* 26: 1543-1549.
- Nishi, O., Nishi, K., Akura, J., Nagata, T. (2001) Effect of round-edged acrylic intraocular lenses on preventing posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 27: 608-613.
- Nishi, O., Nishi, K., Menapace, R., Akura, J. (2001a) Capsular bending ring to prevent posterior capsule opacification: 2-year follow-up. *J Cataract Refract Surg* 27: 1359-1365.
- Nishi, O., Nishi, K. (2002) Preventive effect of a second-generation silicone intraocular lens on posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 28: 1236-1240.
- Nishi, O. (2005) Einfluss von Intraokularlinsenmaterial und -design auf die Nachstarentwicklung. *Ophthalmologie* 102: 572-578.
- Nissen, K.R., Fuchs, J., Goldschmidt, E., Andersen, C.U., Bjerrum, K., Corydon, L., Degn, T., Eisgart, F., Henning, V., Jensen, J.E., Krogh, E., Lowes, M., Mortensen, K., Nielsen, C.H., Olsen, T., Storr-Paulsen, A., Sørensen, T.B., Winther-Nielsen, A. (1998) Retinal detachment after cataract extraction in myopic eyes. *J Cataract Refract Surg* 24: 772-776.
- Ober, M.D., Lemon, L.C., Shin, D.H., Nootheti, P., Cha, S.C., Kim, P.H. (2000) Posterior capsular opacification in phacotrabeculectomy: a long-term comparative study of silicone versus acrylic intraocular lens. *Ophthalmology* 107: 1868-1873.
- Odrich, M.G., Hall S.J., Worgul, B.V., Trokel, S.L., Rini, F.J. (1985) Posterior capsule opacification: experimental analyses. *Ophthalmic Res* 17: 75-84.
- Ohadi, C., Moreira, H., McDonnell, P.J. (1991) Posterior capsule opacification. *Curr Opin Ophthalmol* 2: 46-52.
- Ohara, K., Itakura, K., Ibaraki, N. (1992) Anterior capsule opacification: A cell culture model. *Acta Ophthalmologica (Suppl.)* 205: 29-35.
- Oharazawa, H., et al. (2005) Inhibitory effects of Arg-Gly-Asp (RGD) peptide on cell attachment and migration in a human lens epithelial cell line. *Ophthalmic Res* 37: 191-196.
- Olivero, D.K., Furcht, L.T. (1993) Type IV collagen, laminin, and fibronectin promote the adhesion and migration of rabbit lens epithelial cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2825-2834.
- Olsen, G., Olson, R.J. (2000) Update on a long-term, prospective study of capsulotomy and retinal detachment rates after cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 26: 1017-1021.
- Olson, R.J., Crandall, A.S. (1998) Silicone versus polymethylmethacrylate intraocular lenses with regard to capsular opacification. *Ophthalmic Surg Lasers* 29: 55-58.

- Oner, F.H., Gunenc, Ü., Feriel, S.T. (2000) Posterior capsule opacification after phacoemulsification: Foldable acrylic versus poly(methyl methacrylate) intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 26: 722-726.
- Oshika, T., Suzuki, Y., Kizaki, H., Yaguchi, S. (1996) Two year clinical study of a soft acrylic intraocular lens. *J Cataract Refract Surg* 22: 104-109.
- Oshika, T., Nagata, T., Ishii, Y. (1998) Adhesion of lens capsule to intraocular lenses of polymethylmethacrylate, silicone, and acrylic foldable materials: an experimental study. *Br J Ophthalmol* 82: 549-553.
- Palmade, F., et al. (1994) Inhibition of cell adhesion to lens capsule by LCM 1910, an RGD-derived peptide. *J Ocul Pharmacol* 10: 623-632.
- Pande, M.V., Spalton, D.J., Kerr-Muir, M., Marshall, J. (1996a) Postoperative inflammatory response to phacoemulsification and extracapsular cataract surgery: Aqueous flare and cells. *J Cataract Refract Surg* 22 (suppl 1): 770-774.
- Pandey, S.K., Cochener, B., Apple, D.J., Colin, J., Werner, L., Bougaran, R., Trivedi, R.H., Macky, T.A., Izak, A.M. (2002) Intracapsular ring sustained 5-fluorouracil delivery system for the prevention of posterior capsule opacification in rabbits: a histological study. *J Cataract Refract Surg* 28: 139-148.
- Peng, Q., Apple, D.J., Visessook, N., Werner, L., Pandey, S.K., Escobar-Gomez, M., Schoderbeck, R., Guindi, A. (2000a) Surgical prevention of posterior capsule opacification. Part 2: Enhancement of cortical cleanup by focusing on hydrodissection. *J Cataract Refract Surg* 26: 188-197.
- Peng, Q., Visessook, N., Apple, D.J., Pandey, S.K., Werner, L., Escobar-Gomez, M., Schoderbeck, R., Solomon, K.D., Guindi, A. (2000b) Surgical prevention of posterior capsule opacification. Part 3: Intraocular lens optic barrier effect as a second line of defense. *J Cataract Refract Surg* 26: 198-213.
- Pötzsch, D.F., Pötzsch, C.M. (1996) Four year follow-up of the MemoryLens. *J Cataract Refract Surg* 22 (Suppl 2): 1336-1341.
- Power, W.J., Neylan, D., Collum, L.M.T. (1994) Daunomycin as an inhibitor of human lens epithelial cell proliferation in culture. *J Cataract Refract Surg* 20: 287-290.
- Prajna N.V., Ellwein, L.B., Selvaraj, S., Manjula, K., Kupfer, C. (2000) The Madurai intraocular lens study IV: posterior capsule opacification. *Am J Ophthalmol* 130: 304-309.
- Rabsilber, T.M., Auffarth, G.U. (2006) Pharmakologische Ansätze zur Prävention der Cataracta secundaria. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 223:559-567.
- Ram, J., Kaushik, S., Brar, G.S., Gupta, A. (2001b) Neodymium:YAG capsulotomy rates following phacoemulsification with implantation of PMMA, silicone, and acrylic intraocular lenses. *Ophthalmic Surg Lasers* 32: 375-382.
- Ridley, H. (1951) Intraocular acrylic lenses. *Trans Ophthalmol Soc UK* 71: 617-621.
- Rieck, P.W., Kriegsch, J., Jaeckel, C., Hartmann, C. (2004) Effekt von Suramin auf Proliferation und Migration von Linsenepithelzellen in vitro. *Ophthalmologe* 101: 73-79.
- Rosen, E. (1997) History in the making. *J Cataract Refract Surg* 23: 4-5.
- Ruiz, J.M., Medrano, M., Alió, J.L. (1990) Inhibition of posterior capsule opacification by 5-fluorouracil in rabbits. *Ophthalmic Res* 22: 201-208.

- Sacu, S., Menapace, R., Findl, O., Georgopoulos, M., Buehl, W., Kriechbaum, K., Rainer, G. (2004a) Influence of optic edge design and anterior capsule polishing on posterior capsule fibrosis. *J Cataract Refract Surg* 30: 658-662.
- Sacu, S., Menapace, R., Buehl, W., Rainer, G., Findl, O. (2004b) Effect of intraocular lens optic edge design and material on fibrotic capsule opacification and capsulorhexis contraction.
- Sacu, S., Menapace, R., Findl, O., Kiss, B., Buehl, W., Georgopoulos, M. (2005) Long-Term Efficacy of Adding a Sharp Posterior Optic Edge to a Three-Piece Silicone Intraocular Lens on Capsule Opacification: Five-Year Results of a Randomized Study. *Am J Ophthalmol* 139: 696-703.
- Saika, S., Yamanaka, A., Tanaka, S., Ohmi, S., Ohnishi, Y., Ooshima, A. (1995) Extracellular matrix on intraocular lenses. *Exp Eye Res* 61: 713-721.
- Saika, S., Miyamoto, T., Yamanaka, A., Kawashima, Y., Okada, Y., Tanaka, S.-I., Yamanaka, O., Ohmi, S., Ohnishi, Y., Ooshima, A. (1998a) Immunohistochemical evaluation of cellular deposits on posterior chamber intraocular lenses. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 236: 758-765.
- Saika, S., Kawashima, Y., Miyamoto, T., Okada, Y., Tanaka, S., Yamanaka, O., Ohnishi, Y., Ooshima, A., Yamanaka, A. (1998b) Immunolocalisation of hyaluronan and CD44 in quiescent and proliferating human lens epithelial cells. *J Cataract Refract Surg* 24: 1266-1270.
- Saika, S., Kawashima, Y., Miyamoto, T., Okada, Y., Tanaka, S.I., Ohmi, S., Minamide, A., Yamanaka, O., Ohnishi, Y., Ooshima, A., Yamanaka, A. (1998c) Immunolocalisation of prolyl 4-hydroxylase subunits, alpha-smooth muscle actin, and extracellular matrix components in human lens capsules with lens implants. *Exp Eye Res* 66: 283-294.
- Saika, S., Kawashima, Y., Miyamoto, T., Tanaka, S., Okada, Y., Yamanaka, O., Katoh, T., Ohnishi, Y., Ohmi, S., Ooshima, A., Yamanaka, A. (1998d) Immunolocalisation of prolyl 4-hydroxylase in rabbit lens epithelial cells. *J Cataract Refract Surg* 24: 1261-1265.
- Saika, S., Miyamoto, T., Kawashima, Y., Okada, Y., Yamanaka, O., Ohnishi, Y., Ooshima, A. (2000) Immunolocalization of TGF-beta1, -beta2 and -beta3, and TGF-beta receptors in human lens capsules with lens implants. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238: 283-293.
- Saika, S., Miyamoto, T., Tanaka, T., Ishida, I., Ohnishi, Y., Ooshima, A. (2001) Latent TGFβ binding protein-1 and fibrillin-1 in human capsular opacification and in cultured lens epithelial cells. *Br J Ophthalmol* 85: 1362-1366.
- Saxby, L., Rosen, E., Boulton, M. (1998) Lens epithelial cell proliferation, migration, and metaplasia following capsulorhexis. *Br J Ophthalmol* 82: 945-952.
- Schauersberger, J., Amon, M., Kruger, A., Abela, C., Schild, G., Kolodjaschna, J. (2001) Lens epithelial cell outgrowth on 3 types of intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 27: 850-854.
- Schaumburg, D.A., Dana, M.R., Christen, W.G., Glynn, R.J. (1998) A systematic overview of the incidence of posterior capsule opacification. *Ophthalmology* 105: 1213-1221.
- Schmidbauer, J.M., Vargas, L.G., Apple, D.J., Auffarth, G.U., Peng, Q., Arthur, S.N., Escobar-Gomez, M. (2001) Nachstarrate, Zentrierverhalten, Biokompatibilität und Fixation intraokularer Faltlinsen – eine Millenniums-Analyse 1221 pseudophaker Autopsieaugen. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 218: 1-9.
- Schmidbauer, J.M., Vargas, L.G., Apple, D.J., Escobar-Gomez, M., Izak, A., Arthur, S.N., Golescu, A., Peng, Q. (2002a) Evaluation of Neodymium:yttriumaluminium-garnet Capsulotomies in Eyes Implanted with AcrySof Intraocular Lenses. *Ophthalmology* 109: 1421-1426.

- Schmidbauer, J.M., Escobar-Gomez, M., Apple, D.J., Peng, Q., Arthur, S.N., Vargas, L.G. (2002b) Effect of haptic angulation on posterior capsule opacification in modern foldable lenses with a square, truncated optic edge. *J Cataract Refract Surg* 28: 1251-1255.
- Schmidt, J.F., et al. (1998) Effect of aclacinomycin A on in vitro cultures of porcine lens epithelial cells. *Exp Eye Res* 66: 43-47.
- Schmitt, R., Clozel, J.P., Iberg, N., Buhler, F.R. (1995) Mibefradil prevents neointima formation after vascular injury in rats. Possible role of the blockade of the T-type voltage-operated calcium channel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 1161-5.
- Schmitt-Graff, A., Pau, H., Spahr, R., Piper, H.M., Skalli, O., Gabbiani, G. (1990) Appearance of alpha-smooth muscle actin in human eye lens cells of anterior capsular cataract and in cultured bovine lensforming cells. *Differentiation* 43: 115-122.
- Sellman, T.R., Lindstrom, R.L. (1988) Effect of a plano-convex posterior chamber lens on capsular opacification from Elschnig pearl formation. *J Cataract Refract Surg* 14: 68-72.
- Shah, G.R., Gills, J.P., Durham, D.G., Ausmus, W.H. (1986) Three thousand YAG lasers in posterior capsulotomies: An analysis of complications and comparison to polishing and surgical discission. *Ophthalmic Surg* 17: 473-477.
- Shin, D.H., Kim, Y.Y., Ren, J., Weatherwax, A.L., Pearlman, R.B., Kim, C., Glover, K.B., Muenk, S.B. (1998) Decrease of capsular opacification with adjunctive mitomycin C in combined glaucoma and cataract surgery. *Ophthalmology* 105: 1222-1226.
- Siganos, D.S., Pallikaris, I.G. (1998) Clear lensectomy and intraocular lens implantation for hyperopia from +7 to +14 diopters. *J Cataract Refract Surg* 14: 105-113.
- Spalton, D.J. (1999) Posterior capsule opacification after cataract surgery. *Eye* 13: 489-492.
- Steinert, R.F., Puliafito, C.A., Kumar, S.R., Dudak, S.D., Patel, S. (1991) Cystoid macular edema, retinal detachment, and glaucoma after Nd:YAG laser posterior capsulotomy. *Am J Ophthalmol* 112: 373-380.
- Sterling, S., Wood, T.O. (1986) Effect of intraocular lens convexity on posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 12: 655-657.
- Sun, J., Xie, L.X., Yao, Z. (2003) Experimental study on the prevention of after cataract by heparin drug delivery system. *Zhong hua Yan Ke Za Zhi* 39(7):406-410.
- Sundelin, K., Sjöstrand, J. (1999) Posterior capsule opacification 5 years after extracapsular cataract extraction. *J Cataract Refract Surg* 25: 246-250.
- Sunderraj, P., Villada, J.R., Joyce, P.W., Watson, A. (1992) Glare testing in pseudophakes with posterior capsule opacification. *Eye* 6: 411-413.
- Tan, J.C., Spalton, D.J., Arden, G.B. (1998) Comparison of methods to assess visual impairment from glare and light scattering with posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 24: 1626-1631.
- Tarsio, J.F., Kelleher, P.J., Tarsio, M., Emery, J.M., Man-Kit Lam, D. (1997) Inhibition of cell proliferation on lens capsules by 4197X-ricin A immunoconjugate. *J Cataract Refract Surg* 23: 260-266.
- Tetz, M.R., O'Morchoe, D.J., Gwin, T.D., Wilbrandt, T.H., Solomon, K.D., Hansen, S.O., Apple, D.J. (1988) Posterior capsule opacification and intracocular lens decentration. Part II: Experimental findings on a prototype circular intraocular lens design. *J Cataract Refract Surg* 14: 614-623.

- Tetz, M.R., Sperker, M., Auffarth, G.U., et al. (1996a) Vergleich der Entwicklung der Cataracta secundaria nach Operation von traumatischen und nicht traumatischen Kataraktformen (Abstr.). *Klin Monatsbl Augenheilkd (Suppl.)* 208: 23.
- Tetz, M.R., Sperker, M., Auffarth, G.U., Völcker, H.E. (1996b) Cataracta secundaria nach Operation der maturen Katarakt (Abstr.). *Klin Monatsbl Augenheilkd (Suppl.)* 208: 23.
- Tetz, M.R., Sperker, M., Blum, M., Auffarth, G.U., Völcker, H.E. (1996c) Klinische Nachstarbewertung in pseudophaken Augen. Methode und Reproduzierbarkeit. *Ophthalmologe* 93: 33-37.
- Tetz, M.R., Ries, M.W., Lucas, C., Stricker, H., Völcker, H.E. (1996d) Inhibition of posterior capsule opacification by an intraocular-lens-bound sustained drug delivery system: an experimental animal study and literature review. *J Cataract Refract Surg* 22: 1070-1078.
- Tetz, M.R., Auffarth, G.U., Sperker, M., Blum, M., Völcker, H.E. (1997) Photographic image analysis system of posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 23: 1515-1520.
- Tetz, M.R., Nimsgern, C. (1999) Posterior capsule opacification. Part 2: Clinical findings. *J Cat Refract Surg* 25 (12): 1662-1674.
- Tobari, I., Iwaki, Y., Miyake, K. (1999) Effect of tranilast eyedrops in preventing posterior capsule opacification: Preliminary report. *J Cataract Refract Surg* 25: 1394-1399.
- Ursell, P.G., Spalton, D.J., Pande, M.V., Hollick, E.J., Barman, S., Boyce, J., Tilling, K. (1998) Relationship between intraocular lens biomaterials and posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 24: 352-360.
- van Tenten, Y., et al. (2001) The effect of photodynamic therapy with bacteriochlorin a on lens epithelial cells in a capsular bag model. *Exp Eye Res* 72: 41-48.
- Vargas, L.G., Peng, Q., Apple, D.J., Escobar-Gomez, M., Pandey, S.K., Arthur, S.N., Hoddinott, D.S.M., Schmidbauer, J.M. (2002) Evaluation of 3 modern single-piece foldable intraocular lenses. Clinicopathological study of posterior capsule opacification in a rabbit model. *J Cataract Refract Surg* 28: 1241-1250.
- Vargas, L.G., Escobar-Gomez, M., Apple, D.J., et al. (2003) Pharmacologic prevention of posterior capsule opacification: in vitro effects of preservative-free lidocaine 1% on lens epithelial cells. *J Cataract Refract Surg* 29: 1585-1592.
- Vargas, L.G., Izak, A.M., Apple, D.J., Werner, L., Pandey, S.K., Trivedi, R.H. (2003) Implantation of a single-piece, hydrophilic, acrylic, minus-power foldable posterior chamber intraocular lens in a rabbit model. Clinicopathological study of posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 29: 1613-1620.
- Wang, L., et al. (2005) Sigma receptor antagonists inhibit human lens cell growth and induce pigmentation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 1403-1408.
- Wang, M.C., Woung, L.C. (2000) Digital retroilluminated photography to analyze posterior capsule opacification in eyes with intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 26: 56-61.
- Wang, Y.Q., Brooks, G., Zhu, C.B., Yuang, W.Z., Li, Y.Q., Wu, X.S. (2002) Functional analysis of the human T-type calcium channel alpha 1H subunit gene in cellular proliferation. *Yi Chuan Xue Bao* 29: 659-65.
- Weller, M., Heimann, K., Wiedemann, P. (1987) Cytotoxic effects of daunomycin on retinal pigment epithelium in vitro. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 225: 235-238.
- Weller, M., et al. (1988) Evaluation of daunomycin toxicity on lens epithelium in vitro. *Int Ophthalmol* 12: 127-130.

- Wesendahl, T.A., Hunold, W., Auffarth, G.U., Apple D.J. (1994) Kontaktbereich von Kunstlinse und Hinterkapsel; systematische Untersuchung unterschiedlicher Haptikparameter. *Ophthalmologie* 91: 680-684.
- Wesendahl, T.A., Shalaby, W., Corson, D.W., Auffarth, G.U., Apple, D.J. (1996) Eignung von Polyvinylpyrrolidon als Material für Hydrogelintraokularlinsen. *Ophthalmologie* 93:22–28.
- Westheimer, G., Liang, J. (1994) Evaluating diffusion of light in the eye by objective means. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 2652-2657.
- Westling, A.K., Calissendorff, B.M. (1991) Factors influencing the formation of posterior capsular opacities after extracapsular cataract extraction with posterior chamber lens implant. *Acta Ophthalmol* 69: 315-320.
- Wilkins, M., McPherson, R., Fergusson, V. (1996) Visual recovery under glare conditions following laser capsulotomy. *Eye* 10: 117-120.
- Winther-Nielsen, A., Johansen, J., Pedersen, G.K., Corydon, L. (1998) Posterior capsule opacification and neodymium:YAG capsulotomy with heparin surface-modified intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 24: 940-944.
- Wong, T.T., et al. (2004) MMP inhibition prevents human lens epithelial cell migration and contraction of the lens capsule. *Br J Ophthalmol* 88: 868-872.
- Wormstone, I.M., Liu, C.S.C., Rakic, J.-M., Marcantonio, J.M., Vrensen, G.F.J.M., Duncan, G. (1997) Human Lens Epithelial Cell Proliferation in a Protein-free Medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 396-404.
- Wormstone, I.M., del Rio-Tsonis, K., McMahon, G., Tamiya, S., Davies, P.D., Marcantonio, J.M., Duncan G. (2001) FGF: an autocrine regulator of human lens cell growth independent of added stimuli. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 1305-1311.
- Xie, L., Sun, J., Yao, Z. (2003) Heparin drug delivery system for prevention of posterior capsule opacification in rabbit eyes. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 241: 309-313.
- Yammine, P., Pavon-Djavid, G., Helary, F., Migonney, V. (2005) Surface Modification of Silicone Intraocular Implants To Inhibit Cell Proliferation. *Biomacromolecules* 6: 2630-2637.
- Zaturinsky, B., et al. (1990) Prevention of posterior capsule opacification by cryolysis and the use of heparinised irrigating solution during extracapsular lens extraction in rabbits. *Ophthalmic Surg* 21: 431-434.
- Zwaan, J., Mullaney, P.B., Awad, A., Al-Mesfer, S., Wheeler, D.T. (1998) Pediatric intraocular lens implantation. Surgical results and complications in more than 300 patients. *Ophthalmology* 105: 112-119.

8. Thesen

1. In der modernen Kataraktchirurgie ist der Nachstar nach wie vor die häufigste Komplikation in den ersten fünf Jahren postoperativ. Eine wirksame Vermeidung des Nachstars nach Phakoemulsifikation mit Kunstlinsenimplantation ist derzeit nicht möglich.
2. Ein Ansatz zur Nachstarprophylaxe stellt die pharmakologische bzw. molekularbiologische Beeinflussung durch die intraokulare Applikation von Pharmaka dar. In zahlreichen Studien wurde versucht, geeignete Trägermaterialien zu entwickeln, die es ermöglichen, ein Pharmakon intraoperativ mit dem Ziel zu installieren, dass der Wirkstoff kontinuierlich über einen längeren Zeitraum freigesetzt wird, um somit eine längere Wirkdauer zu gewährleisten.
3. Die Immobilisierung des T-Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil sowie dessen Koppelung an einen Kapselspannring aus Polymethylmethacrylat (PMMA) ermöglicht es, während der Kataraktchirurgie ein pharmakologisch modifiziertes Trägersystem in den Kapselsack zu implantieren.
4. In unseren Untersuchungen prüften wir unter in-vitro-Bedingungen die pharmakologische Wirkung des T-Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil auf die Proliferationshemmung von humanen Linsenepithelzellen.
5. Gelöstes Mibefradildihydrochlorid wurde nach dem Solvent-Evaporation-Verfahren unter Verwendung von Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) verkapselt. Die Wirkstofffreisetzung wurde mittels UV-Spektroskopie untersucht. Die Linkerchemie zwischen Materialoberfläche und Mikrokapseln basiert auf der Amniolyse von Epoxiden. Mittels Tauchverfahren wurden die Mibefradil-beladenen Mikrokapseln an die PMMA-Oberfläche der Kapselspannringe chemisch angekoppelt.
6. Post mortem aus Spenderaugen entnommene Kapselsäcke wurden nach zirkulärer Kapsulorhexis, nach Entfernung von Kern und Rinde sowie

Einbringen eines Kapselspannringes in Zellkultur für durchschnittlich 12 Tage inkubiert. Zellwachstum, Adhäsion auf dem Substrat, Zellmorphologie und Veränderungen im Aktinzytoskelett von hLEZ wurden studiert.

7. Die Solvent-Evaporations-Methode unter Verwendung von Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) ist ein geeignetes Verfahren zur Immobilisierung des T-Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradildihydrochlorid. Die Mibefradil-beladenen Mikrokapseln setzten den Wirkstoff über 50 Tage frei. Dabei zeigte sich eine lineare Wirkstofffreisetzung von 7,9 mg/l [13,89 $\mu\text{mol/l}$] täglich zwischen dem 9. und dem 50. Tag. Am ersten Tag wurden 15,5 mg/l [27,26 $\mu\text{mol/l}$] Mibefradil freigesetzt.
8. Bereits eine Konzentration von 10 μM führte zur Reduktion der Zellfläche und damit zur Hemmung des Zellwachstums.
9. Die metabolische Aktivität der hLEZ betrug unter Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten nach 24 Stunden nur noch 47,6 %. Die metabolische Aktivität nahm also innerhalb von 24 Stunden um 52,4 % ab.
10. Damit im Zusammenhang führt der Einfluss der mit Mibefradil-beladenen Mikrokapseln zu einer deutlichen Reduktion vitaler Zellen. Zudem kam es unter dem Einfluss des T-Kalziumkanal-Antagonisten zu einer Fragmentierung des Aktinzytoskeletts.
11. Die Möglichkeit, zukünftig im Rahmen der Kataraktchirurgie einen pharmakologisch modifizierten Kapselspannring zu implantieren, der kontinuierlich den Wirkstoff freigibt sowie potenziell toxisch nur auf proliferierende Zellen wirkt, stellt somit eine Chance für die Nachstarprophylaxe dar.
12. Weitere Experimente müssen die ersten vielversprechenden Ergebnisse verifizieren. Vorrangig hierbei sollte die Optimierung des Syntheseverfahrens der pharmakologisch modifizierten Mikropartikel sowie eine gleichmäßige Beschichtung der Kapselspannringe sein.

9. Lebenslauf

SABINE KWITTNER

LEBENS LAUF

- Familienstand: ledig
- Nationalität: deutsch
- Geburtsdatum: 14.12.1978
- Geburtsort: Bergen auf Rügen

TÄTIGKEIT

Ärztin in Weiterbildung zur Fachärztin für Ophthalmologie

SCHULBILDUNG

09/1985 – 08/1991: Grundschule; Bergen auf Rügen

09/1991 – 07/1997: Gymnasium; Bergen auf Rügen

Abschluss: allgemeine Hochschulreife

BERUFSAUSBILDUNG

08/1997 – 08/2000: Fachschule am Klinikum der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Abschluss: examinierte Krankenschwester

STUDIUM

10/2000 – 10/2006: Medizin; Universität Rostock

Abschluss: Approbation als Ärztin

FAMULATUREN

10.02.2003 – 07.03.2003: HELIOS Klinikum Berlin – Klinikum Buch; Geriatrische Klinik; Wiltbergstrasse 50, 13125 Berlin

08.09.2003 – 21.09.2003: Sana-Krankenhaus Rügen GmbH; Radiologische Gemeinschaftspraxis Dr. Schnur • Dr. Plümer • Dr. Schnur jr.; Calandstrasse 7/8, 18528 Bergen auf Rügen

02.02.2004 – 14.03.2004: Sana-Krankenhaus Rügen GmbH; Klinik für Anästhesiologie, Interdisziplinäre Intensivmedizin und Perioperative Medizin; Calandstrasse 7/8, 18528 Bergen auf Rügen

12.07.2004 – 05.09.2004: MR W. Nacke; Praxis für Allgemeinmedizin; Hafenstrasse 7a; 18273 Güstrow

13.09.2004 – 28.09.2004: HELIOS Klinikum Berlin – Klinikum Buch; Neurologische Klinik; Hobrechtsfelder Chaussee 96, 13125 Berlin

21.02.2005 – 11.03.2005: Universität Rostock; Augenklinik; Doberaner Strasse 140, 18057 Rostock

PRAKTISCHES JAHR

17.10.2005 – 05.02.2006: Universität Rostock; Univ.-Augenklinik; Doberaner Strasse 140, 18057 Rostock

06.02.2006 – 28.05.2006: Universität Rostock; Klinik für Chirurgie; Abteilung für Kinderchirurgie, Schillingallee 35, 18055 Rostock

29.05.2006 – 17.09.2006: Universität Rostock; Klinik für Innere Medizin; Abteilung für Pneumologie/Abteilung für Gastroenterologie; Schillingallee 35, 18055 Rostock

10. Veröffentlichungen

10.1 Veröffentlichungen

Kwittner, S., Nebe, B., Weidmann, A., Beck, R. (2006) In-vitro-Inhibition humaner Linsenepithelzellen mittels pharmakologisch modifizierter Kapselspannrings zur Prävention der Cataracta secundaria. In: M.R. Tetz, G.U. Auffarth, D.T. Pham (Hrsg.) 21. Kongress der Deutschsprachigen Gesellschaft für Intraokularlinsen-Implantation, Interventionelle und Refraktive Chirurgie. Biermann, Köln. S. 127-133.

Weidmann, A., Kwittner, S., Beck, R., Teller, J., Jonas, L., Nebe, B. (2008) Prevention of Lens Epithelial Cell Growth In Vitro Using Mibefradil-Containing PLGA Micro Particles. The Open Ophthalmology Journal 2: 112-118.

10.2 Vorträge

Frühjahr 2005 Vortrag an der Univ.-Augenklinik Rostock zum Thema: „In-vitro-Inhibition von humanen Linsenepithelzellen mittels eines pharmakologisch modifizierten Kapselspannrings zur Prävention der Cataracta secundaria“ - aktueller Stand der Arbeiten am DFG-Projekt NE 560/5-5

15.-17.03.2007 Vortrag auf dem 21. Kongress der DGII zum Thema: „In-vitro-Inhibition von humanen Linsenepithelzellen mittels eines pharmakologisch modifizierten Kapselspannrings zur Prävention der Cataracta secundaria“, Potsdam

Auszeichnung als **Bester Vortrag** in der V. wissenschaftlichen Sitzung: Nachstar

Frühjahr 2007 Vortrag an der Univ.-Augenklinik Rostock zum Thema: „In-vitro-Inhibition von humanen Linsenepithelzellen mittels eines pharmakologisch modifizierten Kapselspannrings zur

Prävention der Cataracta secundaria“ - aktueller Stand der
Arbeiten am DFG-Projekt NE 560/5-5

20.-21.09.2007 Posterpräsentation zum 105. Kongress der Deutschen
Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG) zum Thema: „In-vitro-
Inhibition von humanen Linsenepithelzellen im
Organkulturmodell mittels pharmakologisch modifizierter
Kapselspannringe zur Prävention der Cataracta secundaria“,
Berlin

11. Danksagung

Zuallererst gilt mein Dank Frau Professor Dr. R. Beck, Universitäts-Augenklinik Rostock, für die Anregung des Promotionsthemas. Sie hat durch ihren jederzeit gewährten, wertvollen Rat, ihre konstruktive Kritik und intensive Betreuung ganz entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. A. Weidmann und Frau PD Dr. B. Nebe, Biomedizinisches Forschungszentrum, Zellbiologie, Universität Rostock, für den wissenschaftlichen Gedankenaustausch. Des Weiteren danke ich Frau C. Hohmann für die Hilfestellungen bei der Arbeit in der Hornhautbank der Universitäts-Augenklinik Rostock.

Schlussendlich danke ich den Menschen von ganzem Herzen, die mich zu dem gemacht haben, was ich heute bin – meine Familie. Meinen Eltern gebührt ein großer Dank für die andauernde Unterstützung und den Zuspruch, all das schaffen zu können. Meinem Lebensgefährten, Herrn Kai-Uwe Schäfer, danke ich besonders für die vielen wertvollen Ratschläge und vor allem für die große Geduld und Ermunterung.

Herrn Professor Dr. R. Guthoff, Direktor der Universitäts-Augenklinik Rostock, danke ich für die Überlassung der Operations- und Laborräume der Klinik sowie für seine Geduld und Hilfestellung, die den Erfolg der Arbeit ermöglicht haben.

12. Erklärung an Eides statt

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Universität Rostock zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Pharmakologische in-vitro-Inhibition von humanen Linsenepithelzellen zur Prävention der Cataracta secundaria

in der Klinik für Augenheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock
(Direktor: Professor Dr. med. R. Guthoff)
unter der Leitung von
Professor Dr. med. R. Beck

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. keinem Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Auszüge aus der Arbeit wurden in den unter Kapitel 10 genannten Publikationsorganen veröffentlicht.

Rostock, 13.Oktober 2010

Unterschrift